







Thèse de doctorat de l'Université Sorbonne Paris Cité Préparée à l'Université Paris Diderot

Ecole doctorale Bio Sorbonne Paris Cité - ED 562

Institut Pasteur / Unité Hépacivirus et immunité innée

Rôle de la protéine HBc du virus de l'Hépatite B sur la biologie des ARN viraux

Par Barbara Quioc-Salomon

Thèse de doctorat de Microbiologie – Option virologie

Dirigée par Christine Neuveut

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 20-09-2019

Présidente du jury : Pr. Sylvie van der Werf – Université de Paris Rapporteur : Dr David Durantel – Université Claude Bernard Lyon 1 Rapporteur : Dr Henri Gruffat – Université Claude Bernard Lyon 1 Examinateur : Dr Monsef Benkirane – Université de Montpelier Examinatrice : Dr Florence Margottin-Goguet – Université de Paris Directrice de thèse : Dr Christine Neuveut – Université de Paris



© (i) (creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/

<u>Résumé</u>

Les patients infectés chroniquement par le VHB ont un risque élevé de développer des maladies graves du foie telles que le carcinome hépatocellulaire. Dans les cellules infectées, le virus persiste sous la forme d'un ADN circulaire covalemment clos (ADNccc) qui reste stable même chez les patients qui suivent un traitement. La protéine virale HBc, en plus de son rôle dans la formation des capsides, est retrouvée dans le noyau et est recrutée sur l'ADNccc et modifie sa structure. Cependant son rôle dans ce contexte n'est pas encore compris.

Afin de mieux comprendre le rôle nucléaire d'HBc notamment sur la biologie de l'ADNccc et l'expression des ARN viraux, nous avons construit plusieurs mutants déficients pour l'expression d'HBc. Nous avons tout d'abord construit un mutant qui possède deux codons stop après le codon 27 d'HBc suivi d'une substitution d'une partie du gène HBc par une séquence codant différents épitopes. Lors de l'infection, ce virus possède un fort défaut d'expression des ARN viraux, qui ne peut être restauré par la ré-expression d'HBc. La quantification des ARN naissants montre que le défaut semble être post-transcriptionnel mais est présent rapidement après la transcription (<2h). Ces résultats suggèrent que le défaut observé est indépendant d'HBc et que la séquence délétée de HBV HBc-Flag27* pourrait être impliquée dans un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle. Grâce à ce virus, nous avons pu mettre en évidence que la protéine HBc apportée avec la capside lors de l'infection est capable de se réassocier sur l'ADNccc dans le noyau. Nous avons ensuite étudié des mutants avant une séquence plus proche de la souche sauvage, sans cette substitution. Lorsqu'ils sont exprimés à partir d'un plasmide exprimant à la fois le génome et la protéine HBc sous le contrôle d'un promoteur SV40, nous observons un défaut d'expression de l'ARNpg pour des mutants possédant les codons stop après le 27e ou le 38e codon du gène HBc, mais pas lorsqu'il est placé après le 67e codon. Ces résultats suggèrent que le déplacement du codon stop d'HBc induit la diminution de l'expression de l'ARNpg et que le codon stop naturel d'HBc pourrait être protégé des voies de surveillance des ARN viraux comme la nonsense-mediated decay (NMD) qui reconnait les ARN avant un codon stop prématuré. Lors des infections par ces virus, et donc en absence d'HBc, nous observons un défaut accru pour les virus ayant des codons stop aux codons 27 et 38 et un défaut apparait pour le virus ayant le codon stop après la position 67. Dans ce contexte, en absence d'HBc, nous avons pu voir que les ARN codants pour les protéines de surface sont également impactés et que l'expression des ARN peut être partiellement restaurée par l'expression d'HBc. Par des techniques de chromosome conformation capture nous avons pu mettre en évidence que le virus HBV HBc-27* n'est plus exclu des régions réprimées contactant des lamines, indiquant que la protéine HBc pourrait être impliquée dans la l'adressage de l'ADNccc vers des régions favorables pour la transcription.

Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation par HBc, nous avons isolé les partenaires nucléaires de la protéine et mis en évidence de nombreux facteurs impliqués dans la régulation de l'ADN et de la transcription ainsi que dans la réparation des dommages à l'ADN.

Dans l'ensemble, nos résultats permettent de mieux comprendre les mécanismes de régulation de la biologie des ARN du VHB.

Mots clefs : VHB, ADNccc, HBc, transcription, stabilité des ARN

Abstract

Chronic HBV carriers (CHB) are at high risk of developing hepatocellular carcinoma. Because covalently closed circular DNA (cccDNA) persists in infected cells through RNA expression, deciphering the mechanisms involved in RNA transcription and stability is a crucial step to identify new antiviral targets. In addition to its role in capsid formation, HBV core protein (HBc) has been shown to be associated with the cccDNA and to modulate its structure, yet the impact of this modification on HBV transcription is not fully understood.

To better understand the role of HBc in this context we constructed several mutants deficient for HBc expression. The first mutant has two stop codons after codon 27 in HBc followed by a substitution of the HBc sequence by a sequence encoding different epitopes. During infection, this virus shows a strong decrease in expression of viral RNA, which cannot be rescued by re-expression of HBc. The quantification of nascent RNAs shows that the defect appears to be post-transcriptional and is present as early as 2h after transcription. These results suggest that the observed defect is independent of HBc and that the deleted sequence in the HBV genome of this mutant could be involved in a post-transcriptional regulatory mechanism. With this mutant, we have been able to demonstrate that the HBc protein provided by the capsid during infection is able to re-associate onto the cccDNA in the nucleus. We then studied HBc mutants generated in the context of the the wild-type virus sequence, without the substitution. When expressed from a plasmid expressing both the genome and the HBc protein under the control of SV40 promoter, we observe a decrease of the pgRNA expression for mutants having the stop codons after the 27th or 38th codon of HBc, but not when the stop codon is located after the 67th codon. These results suggest that displacement of the HBc stop codon induces a decrease in pgRNA expression, independently of HBc protein, and that the natural stop codon of HBc could be protected from viral RNA surveillance pathways such as nonsense-mediated decay (NMD) that recognizes RNAs with a premature stop codon. During infections with these viruses, and therefore in the absence of HBc, we observed an increased in the defect for viruses having stop codons at position 27 and 38 and a defect appears for a virus having the stop codon at position 67. In this context, in the absence of HBc, we have seen that RNAs encoding surface proteins are also impacted and that RNA expression can be partially restored by HBc expression. By chromosome conformation capture techniques we were able to observe that the HBc-27* HBV virus is no longer excluded from repressed regions associated with lamins, indicating that the HBc protein could be involved in the localization of the cccDNA at active chromatin regions favorable for transcription.

In order to understand the mechanisms involved in HBc regulation, we have isolated the nuclear partners of HBc and highlighted many factors involved in the RNA and DNA regulation, in the DNA damage repair and RNA processing.

Overall, our results shed light on the regulatory mechanisms of HBV RNA biology.

Keywords : HBV, cccDNA, HBc, transcription, RNA stability

comme la vie de laboratoire sans toi était plus compliquée et nous a fait réaliser à quel

Merci à Florence L. pour ta bonne humeur et nos partages de déboires de clonage, merci pour ton aide précieuse dans ce domaine !

Je tiens premièrement à remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mes travaux. Tout d'abord Dr. David Durantel et Dr. Henri Gruffat qui ont pris le temps de réviser mon manuscrit mais également Pr. Sylvie van der Werf pour avoir accepté de présider ce jury ainsi que Dr. Florence Margottin-Goguet et Dr. Monsef Benkirane pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

Remerciements

Je tiens ensuite bien sûre à remercier sincèrement Christine. J'ai vraiment énormément apprécié ces 4 années passées sous ta direction. Merci pour ta confiance et ton implication, je me souviendrais longtemps des séances de brainstorming dans ton bureau ! Tu m'as beaucoup apporté scientifiquement, mais aussi humainement ! Je te souhaite vraiment plein de bonheurs et de réussites dans la suite de ton aventure Montpelliéraine !

Je remercie également Eliane pour son accueil dans l'équipe mais également pour sa présence et ses conseils tout au long de ma thèse. Je te souhaite également beaucoup de bonheur pour tes très longues vacances !

Merci à Pierrick d'avoir été mon collègue sans failles de pendant tout mon séjour Pasteurien ! Ça a été un vrai bonheur de travailler/discuter/chanter avec toi et tu m'as aidé plus d'une fois à passer les coups de mou du labo ! En parlant de chanter au labo, je remercie également Lisette d'avoir réussi à tant me transmettre en seulement 6 mois !

Je remercie ensuite Patrick, pour ses précieux conseils, son aide et bien sûr pour sa bonne humeur quotidienne qui faisait rayonner le laboratoire (je t'imagine déjà lever les yeux au ciel quand j'écris ces lignes !). Je te souhaite sincèrement beaucoup de bonheurs et de sérénité pour la retraite !!

Je remercie ensuite ma petite loutre du laboratoire, Coralie. Ça a vraiment été un bonheur de partager ces dernières années avec toi ! Ta douceur m'a vraiment énormément apportée ! Je te souhaite plein de succès et de bonheur pour la suite, tu le mérites !

Merci aussi à Steph pour tes conseils mais bien sûr aussi pour ta bonne humeur, ta présence et tout ce que tu apportais au labo ! Je continuerais à penser à toi dès que je mangerais de la pizza... pepperoniii !!

humeur, mais aussi les moments où tu râlais qui me faisaient beaucoup rire ! C'est fou

point ton travail nous facilitait le quotidien ! Je regretterais vraiment de n'avoir pas pu

aller faire les vendanges avec toi, l'année prochaine peut être qui sais ?

Je remercie aussi Momo pour ta ton aide avec « les bébêtes », ta bonne

Merci aussi à Eugénie qui m'a aidé dans la construction de certains plasmides. Ça n'a pas été une mince affaire mais on a tenu bon et finalement la persévérance a payé !

Thanks also to Irene who was very helpful during my thesis writing to test some hypothesis I had, even if you were already busy! I wish you a lot of success and joy in Montpellier !

Merci bien sûr à Agathe, mon petit caneton, d'être passée par le labo, et finalement de n'être jamais vraiment partie ! Merci pour toutes ces folles aventures, ces chameaux et d'être toujours là quand il le faut !

Merci aussi à Maeva, de m'avoir supporté et épaulé dans les derniers mois de la thèse ! C'était un vrai bonheur de t'avoir au labo et aussi en dehors pendant ces six mois !

Merci également à Dimitri dont les petites perles me feront toujours rire ! Bon courage pour la thèse !

Merci à toutes les personnes de l'étage, que je croise tous les jours et qui m'ont aidé de près ou de loin et notamment aux ONO !

Après avoir remercié les personnes m'ayant entouré au laboratoire, je voudrais bien sûr ensuite remercier mes proches :

Je vais évidemment commencer par ma famille. Merci à mes parents et à Simon, Leïla, Lucie et Martin pour votre soutien sans failles ! Merci aussi à tout le reste de la famille, c'est une chance d'avoir une famille soudée et belle comme la notre, ne changeons rien !

Ce n'est pas la famille mais c'est tout comme : Je remercie ma loutre de toujours, Charlotte, pour son soutien, son amitié, sa présence, sa joie de vivre et j'en passe ! C'est vraiment un bonheur de t'avoir à mes côtés depuis 20 ans (!!!).

Merci à toutes les têtes de chats !! Trop nombreux pour vous citer mais vous savez à quel point vous comptez et à quel point c'est un bonheur de vous retrouver à chaque fois que je rentre en Bretagne !

Merci à tous les amis du master de virologie pour tous ces bons moments partagés ensemble !! Merci en particulier à Marion pour le soutient que l'on s'est donnée jusqu'à la fin mais aussi pour les délires et pour ton grain de folie ! J'espère qu'un jour on sera vraiment considérée en tant que telle et qu'on arrête d'être victime des colifichets ! Merci bien sûr aussi à Flo pour sa présence depuis le master et tous les partages musicaux ! Mais aussi Souheyla, Lucie, Mel DS et Ghina pour leur soutien pendant ces quatre années !

Merci aussi à Alex et Céline ! Je suis contente d'être venue sur Paris juste pour le fait de vous avoir rencontré et je ne suis certaine que je n'aurais pu finir ma thèse dans le même état sans vous !



Merci aussi aux loutres d'Ottership, particulièrement à Corentine et Nico ! Je suis vraiment heureuse de vous avoir rencontré et de vous avoir eu pour échapper à la vie de labo quand je le pouvais !!

Enfin, merci à tous ceux qui ne sont pas directement cités, mais qui m'ont aidé et soutenu pendant ces quatre années de thèse ou même avant ! Famille, Amis, Collègues, sans vous je n'y serais pas arrivé !

Table des matières

Remercie	ements	III
Table de	s illustrations	VIII
Abréviati	ons	X
Introduct	on	1
	1. LE VIRUS DE L'HEPATITE B	2
	A. DES HEPATITES A LA DECOUVERTE DU VIRUS DE L'HEPATITE B	2
	B. PATHOLOGIE ET TRANSMISSION	3
	C. PREVENTION ET TRAITEMENT	8
	D. EPIDEMIOLOGIE	10
	E. LA FAMILLE DES HEPADNAVIRIDAE : ORIGINE ET EVOLUTION	11
	F. STRUCTURE DES PARTICULES VIRALES	14
	G. GENOME DU VHB	14
	H. PROTEINES VIRALES	17
	2. REPLICATION DU VHB	29
	A. ENTREE DU VHB DANS LES HEPATOCYTES	30
	B. TRANSPORT DE LA PARTICULE VERS LE NOYAU ET LIBERATION DE L'ADN RC	32
	C. FORMATION DE L'ADNCCC	34
	D. TRANSCRIPTION VIRALE ET EXPORT DES ARN.	35
	E. ENCAPSIDATION DE L'ARNPG ET RETROTRANSCRIPTION	36
	F. Sortie des particules virales	39
	3. REGULATION DE LA BIOLOGIE DES ARN VIRAUX : UNE ETAPE CRUCIALE POUR LE MAINTIEN	DE LA
REPLICAT	on. 40	
	A. REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE	40
	B. REGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE	54
	4. REGULATION DE LA BIOLOGIE DES ARN VIRAUX PAR LA PROTEINE HBC	64
	A. LOCALISATION NUCLEAIRE DE LA PROTEINE HBC.	65
	B. HOMOLOGIES AVEC DES PROTEINES IMPLIQUEES DANS LA REGULATION DE L'EXPRESSION DES ARN.	67
	C. LA PROTEINE HBC : UNE FONCTION DE FACTEUR DE TRANSCRIPTION ?	68
	D. REGULATION POST TRANSCRIPTIONNELLE PAR LA PROTEINE CORE	70
Résultats	·	71
	PARTIE I · ETUDE DES VIRUS DEEICIENTS POUR LA PROTEINE HBC	72
		/3
	A. ETUDE DU MUTANT HBV HBC-FLAG2 / *	/5
	B. ETUDE DU MUTANT HBV HBC-2/*	85
	L. IMPACT DE LA POSITION DU CODON STOP D'HEC SUR LA STABILITE DE L'AKNPG Partie II – Purification et etude des dartenaires nucleaires d'HEC	95
	PARTIE II - PORIFICATION ET ETODE DES PARTENAIRES NUCLEAIRES D'FIDC	100
	A. CONTEXTE	101
	B. ISOLATION DES PARTENAIRES NUCLEAIRES D'HBC.	101
	C. INTERACTION AVEC LA PROTEINE SRSF1.	103
	D. INTERACTION AVEC LE COMPLEXE FACT	105
	E. INTERACTION DE LA PROTEINE HBC AVEC LES PROTEINES HISTONES.	107
	F. INTERACTION AVEC USP3	109
	G. INTERACTION AVEC LES PROTEINES DES VOIES DE REPARATION DE DOMMAGES A L'ADN	109

Discussion	112
• HBV HBC-FLAG27* : REPERCUSSIONS DE LA MUTATION SUR LA BIOLOGIE DES	ARN VIRAUX 113
HBV ET PROTECTION CONTRE LA VOIE DE DEGRADATION DES ARN NON-SENS :	ETUDE DE LA POSITION DU
CODON STOP DANS LA SEQUENCE D'HBC.	116
• ROLE D'HBC REGULE SUR LA LOCALISATION NUCLEAIRE DE L'ADNCCC	
 RECRUTEMENT DE LA PROTEINE HBC PROVENANT DE LA CAPSIDE SUR L'AD 	NCCC : UN ROLE DANS LA
FORMATION DE L'ADNCCC ?	
◆ LE MUTANT HBV HBC-67* : UN BON CANDIDAT POUR ETUDIER LE ROLE D'H	BC SUR LA REGULATION DE
L'ADNCCC. 123	
• INTERACTION D'HBC AVEC LE COMPLEXE FACT	
Matériel et méthodes	128
Bibliographie	
Annexes	172
HEPATITIS B VIRUS REPLICATING IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA ENCODES HBX V	ARIANTS WITH PRESERVED
ABILITY TO ANTAGONIZE RESTRICTION BY SMC5/6	173

Table des illustrations

FIGURE 1 : EVOLUTION D'UNE INFECTION PAR LE VHB.	3
FIGURE 2 : INFECTION AIGÜE PAR LE VHB ET PASSAGE A LA CHRONICITE. (ADAPTE DE LIAW AND CHU, 2009)	. 4
FIGURE 3 : HISTOIRE NATURELLE DE L'INFECTION CHRONIQUE PAR LE VHB (ADAPTE DE LIAW AND CHU 2009). 6
FIGURE 4 : PREVALENCE DU VHB DANS LE MONDE.	11
FIGURE 5 : FAMILLE DES HEPADNAVIRIDAE (TIRE DE LITTLEJOHN ET AL., 2016)	12
FIGURE 6 : REPARTITION MONDIALE DES DIFFERENTS GENOTYPES DU VHB. (TIRE DE LITTLEJOHN ET AL., 20)16)
	13
FIGURE 7 : STRUCTURE DU VHB.	15
FIGURE 8 : ORGANISATION GENOMIQUE DE L'ADN-RC ET TRANSCRITS VIRAUX. (TIRE DE VIRALZONE)	16
FIGURE 9 : STRUCTURE DES PROTEINES DE SURFACE ET ANCRAGE DE CES PROTEINES A LA MEMBRANE DU	RE.
	19
FIGURE 10 : STRUCTURE DE LA PROTEINE HBC, DES DIMERES ET DES CAPSIDES VIRALES.	20
FIGURE 11 : STRUCTURE DE LA POLYMERASE VIRALE, HBV POL	23
FIGURE 12 : SYNTHESE DE LA PROTEINE HBE.	24
FIGURE 13 : STRUCTURE DE LA PROTEINE HBX.	25
FIGURE 14 : SYNTHESE DE LA PROTEINE HBSP.	28
FIGURE 15 : CYCLE VIRAL DU VHB.	30
FIGURE 16 : SEQUENCE E ET AMORÇAGE PROTEIQUE.	37
FIGURE 17 : RETROTRANSCRIPTION DE L'ARNPG EN ADN RC (ADAPTE DE HU AND SEEGER 2015).	38
FIGURE 18 : REGULATION DE L'EXPRESSION DU PROMOTEUR PREC/C.	41
FIGURE 19 : REGULATION DE L'EXPRESSION DU PROMOTEUR PRES1.	43
FIGURE 20 : REGULATION DE L'EXPRESSION DU PROMOTEUR PRES2/2.	45
FIGURE 21 : REGULATION DE L'EXPRESSION DU PROMOTEUR D'HBX.	46
FIGURE 22 : REGULATION DE L'ACTIVITE DE L'ENHANCER I.	47
FIGURE 23 : REGULATION DE L'ACTIVITE DE L'ENHANCER II.	48
FIGURE 24 : ÎLOTS CPG SUR L'ADN VIRAL (ADAPTE DE JAIN ET AL., 2015).	49
FIGURE 25 : REGULATION EPIGENETIQUE DE L'ADNCCC EN PRESENCE OU EN ABSENCE D'HBX (ADAPTE DE HO	ONG
ET AL. 2017)	52
FIGURE 26 : VARIANTS D'EPISSAGE DES ARN VIRAUX (TIRE DE SOMMER ET HEISE, 2008).	56
FIGURE 27 : REGULATION DE L'EPISSAGE DES ARN VIRAUX.	57
FIGURE 28 : REGULATION DE L'EXPORT DES ARN VIRAUX NON EPISSES.	59
FIGURE 29 : REGULATION DE LA STABILITE DES ARN VIRAUX NON EPISSES	62
FIGURE 30 : SIGNAUX DE LOCALISATION CELLULAIRES PRESENT DANS LE DOMAINE C-TER D'HBC.	66
FIGURE 31 : PRODUCTION DE VIRUS DEFICIENTS POUR HBC.	74
FIGURE 32 : ETUDE DE L'EXPRESSION DU PLASMIDE PRHBV1.3HBC-FLAG27*/HBC.	76

FIGURE 33 : ANALYSE DES PRODUCTIONS VIRALES PAR GRADIENT DE IODIXANOL.	77
FIGURE 34 : QUANTIFICATION DE L'ADNCCC APRES INFECTION PAR LE VIRUS VHB HBC-FLAG27*.	78
FIGURE 35 : ANALYSE DE L'EXPRESSION DES TRANSCRITS VIRAUX LORS D'UNE INFECTION HBV HBC-FLAG27	*. 79
FIGURE 36 : CARACTERISATION DU DEFAUT D'ARN VIRAUX APRES INFECTION PAR LE VHB HBC-FLAG27*.	80
FIGURE 37 : INFECTION DE PHH AVEC LE VIRUS HBV HBC-FLAG27*	81
FIGURE 38 : QUANTIFICATION DES ARN NAISSANTS.	82
FIGURE 39 : ETUDE DU RECRUTEMENT DE LA PROTEINE HBC SUR L'ADNCCC.	83
FIGURE 40 : TRANSCOMPLEMENTATION PAR HBC ET/OU HBX LORS DES INFECTIONS.	84
FIGURE 41 : ETUDE DE L'EXPRESSION DU PLASMIDE PHBV1.3 HBC-27*/HBC	87
FIGURE 42 : ETUDE DE L'INFECTION PAR LE VIRUS HBV HBC-27*	88
FIGURE 43 : CARACTERISATION DU DEFAUT PRESENT CHEZ LE VIRUS HBV HBC-27*	89
FIGURE 44 : QUANTIFICATION DES ARN NUCLEAIRES ET CYTOPLASMIQUES.	90
FIGURE 45 : TRANSCOMPLEMENTATION PAR HBC LORS DE L'INFECTION PAR HBV HBC-27*	91
FIGURE 46 : CONTACTS DES VIRUS HBV WT ET HBV HBC-FLAG AVEC LE GENOME.	93
FIGURE 47 : IMPACT DE LA PRESENCE D'UN CODON STOP DANS LE GENE HBC SUR LA STABILITE DE L'ARNPO	G. 96
FIGURE 48 : PREDICTION DES STRUCTURES SECONDAIRES DE L'ARNPG.	97
FIGURE 49 : ETUDE DE LA TRANSCRIPTION VIRALE APRES INFECTION PAR LES DIFFERENTS MUTANTS DEFICI	ENTS
POUR HBC.	98
FIGURE 50 : VERIFICATION DE L'EXPRESSION DE LA PROTEINE HBC DANS LES LIGNEES TRANSDUITES.	102
FIGURE 51 : IDENTIFICATION DES PARTENAIRES NUCLEAIRES D'HBC PAR SPECTROMETRIE DE MASSE	103
FIGURE 52 : ROLE DE LA PROTEINE SRSF1 SUR L'EXPRESSION DES ARN VIRAUX.	104
FIGURE 53 : CONFIRMATION DE L'INTERACTION D'HBC AVEC LE COMPLEXE FACT.	105
FIGURE 54 : ETUDE DU ROLE DU COMPLEXE FACT SUR LA TRANSCRIPTION VIRALE	106
FIGURE 55 : ETUDE DU RECRUTEMENT DE LA PROTEINE SPT16 SUR L'ADNCCC	107
FIGURE 56 : INTERACTION D'HBC AVEC LES PROTEINES HISTONES.	108
FIGURE 57 : INTERACTION D'HBCY132A AVEC USP3.	109
FIGURE 58 : INTERACTION D'HBC AVEC LES TOPOISOMERASES I ET IIB	110
FIGURE 59 : PARALLELE ENTRE LE PLASMIDE PRHBV1.3 HBC-FLAG27*/HBC ET L'ADN RC HBV HBC-FLAG27*.	. 114
FIGURE 60 : MODELE DE DESTABILISATION DE L'ARNPG PAR L'INTRODUCTION DE CODONS STOPS.	118
FIGURE 61 : MODELE SCHEMATIQUE DU RECRUTEMENT DE LA PROTEINE HBC PROVENANT DE LA CAPSIDE	E SUR
L'ADNCCC.	122
FIGURE 62 : PREPARATION DES BANQUES HI-C	138

Abréviations

ADN	Acide Desoxyribonucléique
ADN Pol II	ADN polymérase II
ADN polk	ARN polymérase κ
ADN RC	ADN Relaché criculaire
ADNccc	ADN circulaire covalement clos
AID	Activation-induced cytidine desaminase
ALT	Alanine aminotransférase
AP-1	Protéine Activatrice 1
ARD	Arigine Rich Domain
ARN	Acide Ribonucléique
ARNpg	ARN prégénomique
ATF	Activating transcription factor 1
BCP	Basal core promoter
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
Cfp1	Cellular factor CXXC finger protein 1
СНВ	Hepatite B chronique
CHC	Carcinome Hépatocellulaire
Ch-IP	Chromatine Immunoprecipitation
CMV	Cytomegalovirus
COUP-TF	Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor
СрАМ	Core protein Allosteric Modulator
CpGi	llot CpG
CREB	Cyclic AMP-response element binding protein
Crm1	Chromosomal maintenance 1
CRUS	Core upstream regulatory sequence
CTD	COOH Terminal Domain
CTL	Lymphocytes T cytotoxiques
DDB1	DNA damage-binding protein 1
DDR	DNA Dammage Response
DDX5	DEAD-Box Helicase 5
DHBV	Duck Hepatitis B virus

DMT	DNA methyl transferases
DR5	Death receptor 5
DynLL1	Dynein light chain LC8-type 1
EGF	Epidermal Growth factor
ELISA	Enzyme Linked immunosorbent assay
ESCRT	Endosomal sorting complexes required for transport
EU	Ethynyl-Uridine
Exosc	Exosome component
FACT	Facilitates Chromatine Transcription
FTF	fetoprotein transcription factor
H3K27Ac	Histone 3 acétylée sur la lysine 27
H3K4me3	Histone 3 triméthylée sur la lysine 4
H3K9me3	Histone 3 triméthylée sur la lysine 27
HAP	Heteroaryldihydropyrimidine derivatives
HAT	Histones acétyles transférases
HBeAg	Antigène Hbe
HBsAg	Antigène HBs
HDAC1	histones dé-acétylase 1
HNF	Hepatocytes nuclear factor
HSP	Heat shock protein
HSPG	Heparane sulfate proteoglycane
IFITM1	Interferon-induced transmembrane protein 1
IFN	Interferon
ISS	Intron splicing silencer
JMJD	Jumonji domain containing
LEDGF/P75	Lens epithelium-derived growth factor
LTR	Long Terminal Repeat
MET	Microscope Electronique à Transmission
MLL	Mixed-Lineage Leukemia
MPT	Modification post-transcriptionnelle
NES	Nuclear Export Signal
NEXT	Nuclear Exosome targetting
ΝϜκΒ	Nuclear factor-kappa B
NIRF	Np95/ICBP90-like RING finger protein

	NLS	Nuclear Localization Signal
	NMD	Nonsense Mediated Decay
	NPC	Nuclear Pore complex
	NRE	Negative regulatory element
	NRF1	Nuclear respiratory factor 1
	NTCP	Sodium Tauchlorate Co-transporting Polypeptide
	NXF1	Nuclear export factor 1
	NXT1	NTF2-related export protein 1
	OMS	Organisation Mondiale pour la Santé
	ORF	Open Reading Frame
	PCR2	Complexe répresseur polycomb 2
	PHH	Primary human hepatocyte
	PLK1	Polo-like-kinase 1
	PML	Promyelocytic leukemia protein
	Prdx1	Peroxiredoxin
	PRE	Post-transcriptional regulatory element
	PRMT5	Protein arginine N-methyltransferase 5
	Prox1	Protéine Prospero-related homeobox
	PSF	PTB associated splicing factor
	РТВ	polypyrimidine tract-binding protein
	PUF60	Poly(U) Binding Splicing Factor 60
	RBM24	RNA binding protein 24
	RE	Réticulum Endoplasmique
	RSE	RNA stability Element
	RSV	Virus du Sarcome de Rous
	RXRα/PPARα	Retinoid X receptor α /Peroxysome proliferator activated
recep	tor alpha	
	SEP1	Sub Element of PRE1
	SETDB1	SET domain bifurcated 1
	Sirt1	Sirtuin1
	SKIV2L	superkiller viralicidik activity 2 like
	SMC5/6	Structural Maintenance of Chromosomes protein 5/6
	SP1	Specificity protein 1
	SPT16h	Facilitates chromatin transcription complex subunit SPT16

SRE-1	Splicing regulatory element 1
SRPK	SR protein-specific kinase
SRSF1	Serine Rich Splicing Factor 1
SRSF3	Serine Rich Splicing Factor 3
SSRP1	Structure-specific recognition protein 1
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TADs	Topologically associating domains
TAP	Tip associated protein
TARDBP	Trans-activation responsive DNA binding protein
TBP	TATAbox binding protein
TCF7L2	Transcription Factor 7 Like 2
TDP2	Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TLM	Motif de Translocation Membranaire
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha
ТороІ	Topoisomérase I
ΤοροΙΙβ	Topoisomérase IIβ
TREX1	Transcription-Export complex 1
UPF	Up-frameshift suppressor
USP3	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 3
VHB	Virus de l'Hépatite B
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
WHV	Woodchuck Hepatitis Virus
ZC3H18	Zinc finger CCCH domain-containing protein 18

Introduction

1. Le virus de l'Hépatite B

A. Des hépatites à la découverte du virus de l'Hépatite B.

Les symptômes de l'hépatite sont décrits depuis l'Antiquité, notamment par Hippocrate, qui en -420 décrivait déjà des ictères chez ses patients. Au XIXe siècle la présence de nombreuses épidémies de jaunisse dans les campements armés a fait apparaitre le terme d'hépatite épidémique. EN 1885, Lurman décrit une épidémie d'hépatite sérique après une campagne de vaccination contre la variole. S'ensuivra une importante épidémie en 1942, où plus de 50 000 soldats des troupes américaines contracteront une jaunisse à la suite d'une campagne de vaccination de masse contre la fièvre jaune (Freeman, 1946). Dans les deux cas, le vaccin utilisé avait été établi à partir de sérum humain. A partir de cette période, il sera alors possible de différencier les « hépatites infectieuses », qui seront attribuées plus tard au virus de l'hépatite A des « hépatites sériques » attribuées au virus de l'Hépatite B (VHB). C'est l'identification par Blumberg en 1964 d'un antigène présent dans le sérum d'un patient australien qui permet d'identifier l'origine virale de la maladie et lui vaudra le Prix Nobel de physiologie ou de médecine en 1976 (Alter and Blumberg, 1966; Blumberg et al., 1965). Cet antigène sera formellement associé en 1967 au virus de l'hépatite B comme étant l'antigène HBsAg et permettra par la suite un dépistage systématique de l'antigène avant transfusion sanguine. La particule virale est observée au microscope électronique à transmission (MET) pour la première fois en 1970 (Dane et al., 1970) et l'auteur de cet ouvrage donnera son nom à la particule virale infectieuse, toujours appelée aujourd'hui la « particule de Dane ». Le génome du virus sera cloné moins de 10 ans plus tard par l'équipe du professeur Pierre Tiollais à l'Institut Pasteur (Galibert et al., 1979).

Ces découvertes ont mené à une course à l'établissement d'un vaccin qui fut rapidement fructueuse, et dès 1981 le premier vaccin, provenant de sérum de patient inactivé fut approuvé (Maupas et al., 1976). Quelques années plus tard (1986) un vaccin recombinant, plus sure, a été mis en place par une équipe de l'Institut Pasteur (Milich et al., 1985).

B. Pathologie et transmission.

Hépatite Virale

Le virus de l'hépatite B est à l'origine d'hépatites aiguës ou chroniques (CHB). La chronicité de l'infection va majoritairement dépendre de l'âge auquel est contractée l'infection. Dans 95% des cas, un adulte en bonne santé va développer une hépatite aiguë. Dans ce cas, le virus ne sera détectable qu'après une période d'incubation de 45 à 180 jours. L'infection sera majoritairement asymptomatique (2/3 des cas) ou pourra aboutir au développement d'ictères, mais se développera très rarement en hépatite fulminante (<0.5% patient) (Burns and Thompson, 2014) (Figure 1).



Figure 1 : Evolution d'une infection par le VHB.

Le diagnostic d'une hépatite B aiguë se fait tout d'abord par une détection de niveaux élevés d'alanine aminotransférase (ALT) et de bilirubine. Il est alors possible de quantifier les marqueurs spécifiques de l'hépatite B ce qui va permettre d'évaluer le stade de l'infection : l'ADN viral, les antigènes HBs et HBe (HBsAg et HBeAg) et les anticorps IgM-antiHBs (Figure 2). Le virus semble se répliquer sans induire de réponse immunitaire innée. Les études menées chez le chimpanzé ne montrent pas d'induction de l'interféron (IFN) de type I, contrairement une infection par le Virus de l'Hépatite C (VHC) bien que chez la souris l'induction de l'IFN de type I soit capable de contrôler l'infection par le VHB (Su et al., 2002; Wieland et al., 2004). L'élimination du virus se fait majoritairement de façon non cytopathique par le biais de cytokines comme le TNF α (Tumor Necrosis Factor α) et l'IFN- γ après infiltration de lymphocytes T

cytotoxiques (CTL) spécifiques pour le VHB dans le foie. (Guidotti et al., 1996; Bertoletti et al., 2003). Cependant l'augmentation de l'ALT dans le sérum des patients est le signe que le foie est endommagé (ALT >500 IU/m). Dans certains cas, l'activation des CTL peut conduire à une plus forte destruction des hépatocytes, ce qui aboutit chez les patients au développement des signes de l'hépatite aiguë tels que le jaunissement de la peau et des yeux (Ictère) ainsi qu'une coloration sombre des urines, une grande fatigue, nausées, vomissement et douleurs abdominales.

Le passage à l'état d'infection chronique est suspecté lorsque l'antigène HBe est détecté plus de 10 semaines après l'infection et généralement confirmé lorsque l'on observe la persistance de HBsAg plus de 5 mois après infection (Figure 2).

C'est lorsque l'infection se produit pendant l'enfance, et particulièrement avant 6 ans que le risque de développer une infection chronique est élevé. En l'absence de traitement, on estime à 80-90% le risque de développer une hépatite chronique si l'infection se fait lors de la première année de la vie, à 20-30% lorsque l'enfant est âgé



Figure 2 : Infection aigüe par le VHB et passage à la chronicité. (Adapté de Liaw and Chu, 2009).

Après infection, le virus va se répliquer dans les hépatocytes et les marqueurs viraux (ADN, antigènes, et anticorps) ne seront détectables que 1 à 2 mois après infection. S'ils apparaissent, les symptômes n'apparaîtront qu'après plusieurs mois, mais dans la plupart des cas, l'infection sera asymptomatique. La transition vers une infection chronique sera suspectée si l'antigène HBe est détecté plus de 3 mois après l'infection et confirmé si l'antigène HBs est toujours retrouvé plus de 6 mois après l'infection.

de moins de 6 ans et environ 6% si l'infection se fait avant la 15^e année. (Liaw and Chu, 2009). Le statut immunitaire va également influencer le devenir de l'infection.

Le développement de l'hépatite chronique peut être divisé en plusieurs phases présentées dans la Figure 3 :

- La phase de tolérance immunitaire ou d'infection chronique positive pour HBeAg est la première phase où le virus va se répliquer de façon importante chez le patient. On retrouvera un nombre de copies d'ADN important (>10⁹/ml) dans le sérum et une séropositivité pour HBsAg et HBeAg. Malgré cela, aucun effet cytopathique n'est détecté et le niveau d'ALT reste normal. Cette phase est très longue, et peut durer pendant plus de 30 ans sans manifestations cliniques évidentes.
- La seconde phase ou hépatite chronique positive pour HBeAg, est une phase d'activité immunitaire et est marquée par des niveaux d'ALT et d'ADN viral fluctuants dans le sérum. Une séroconversion pour HBe va se mettre en place avec une diminution des quantités d'HBeAg et une augmentation de l'anticorps anti-HBe. Un passage de l'antigène HBc du noyau vers le cytoplasme est également à noter lors de cette phase (Chu et al., 1995). Lors de cette période, on note l'apparition de cytopathie comme des fibroses qui peuvent déboucher sur des cirrhoses (dans 10 à 20% des cas). L'âge de la séroconversion va fortement influer le risque de développer des pathologies graves par la suite (Chen et al., 2010). Le VHB n'étant pas cytolytique, cet état est dû à l'activation du système immunitaire.
- À la suite de la séroconversion HBe, les patients vont entrer dans la troisième phase de porteur inactif ou d'hépatite chronique négative pour HBe. A ce moment la quantité d'ADN viral tombe sous 2000 IU/ml voire est indétectable dans le sang et le niveau d'ALT reviennent à la normale. Bien que la séroconversion soit un signe favorable, plus de 20% des patients développeront des pathologies hépatiques graves comme la cirrhose ou un carcinome hépatocellulaire (CHC) (Hsu et al., 2002).
- Chez 20 à 30% des patients une phase de réactivation virale sera observée. Celleci peut être spontanée ou causée par une immunosuppression. Comme lors de la seconde phase on retrouvera une quantité fluctuante d'ALT et d'ADN viral dans le sérum du patient, associé ou non avec HBe. Lors de ces réactivations sans

réversion du statut HBe on retrouve pour une majorité de patients des mutations dans la région précore du virus permettant l'expression d'HBe (Yuen et al., 2002).



Figure 3 : Histoire naturelle de l'infection chronique par le VHB (Adapté de Liaw and Chu 2009).

L'infection chronique par le VHB se déroule en 3 phases de durée variable. Dans la première phase d'infection chronique HBe+, le virus se réplique à un niveau élevé et l'ADN et l'antigène HBe sont détectables dans le sang mais les niveaux d'ALT restent normaux. Lors de la phase d'hépatite chronique HBe+, les niveaux d'ALT et d'ADN fluctuent, et les anticorps anti-HBe apparaissent, et la quantité de protéines HBe dans le sérum diminue. La dernière phase d'hépatite chronique HBe- est marquée par la présence d'anticorps anti-HBe et une réplication plus faible du virus. Des réactivations virales peuvent cependant émerger et le virus sera de nouveau détectable.

La présence de niveaux élevés d'ADN viral dans le plasma et une longue phase d'infection chronique HBe+ sont des marqueurs de risque pour le développement de la cirrhose ou du carcinome hépatocellulaire. (Chen et al., 2006)

Un dernier type d'infection liée au virus est décrit sous le nom hépatite occulte. Dans ce cas le virus n'est plus détectable, ni par l'antigène HBs ni par HBe par les techniques de détection couramment utilisées, mais il est possible de détecter de l'ADN viral dans le foie des patients. Cette répression de l'expression du virus pourrait venir d'un contrôle par la réponse innée et adaptative mais également par l'introduction de mutations génétiques ou par une répression épigénétique du virus (Makvandi, 2016).

VHB et Carcinome hépatocellulaire

D'après le dernier rapport de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), le CHC est le troisième cancer le plus mortel avec un peu plus de 780 000 morts en 2018. Plus de 800 000 nouveaux cas sont décelés chaque année. Il est possible d'associer la répartition géographique du CHC avec les régions endémiques pour le VHB. En plus du VHB, de nombreux facteurs peuvent influencer l'apparition du CHC comme par exemple la consommation d'alcool, le diabète ou encore l'obésité. Mais les campagnes de vaccinations pour le VHB mises en place depuis 25 ans ont déjà montré leur efficacité avec une réduction significative du nombre de cas de CHC dans les régions endémigues renforçant l'idée que le VHB est un déterminant majeur dans l'apparition du CHC (Huang and Lin, 2000). Plus de la moitié des CHC sont associés à une infection par le VHB et les virus infectants les autres mammifères comme le WHV chez la marmotte sont également associés à l'apparition de cancer du foie (Tennant et al., 2004). Plusieurs facteurs intrinsèques au VHB comme le génotype viral ainsi que des mutations précises semblent être des facteurs de risque (Fung and Lok, 2004). Les tumeurs associées au virus sont corrélées à une surexpression des gènes du cycle cellulaire et de la prolifération ainsi que des gènes normalement exprimés dans le foie foetal (Buendia and Neuveut, 2015).

Plusieurs mécanismes induits par le virus peuvent être à l'origine de ces changements. Tout d'abord, le génome viral est retrouvé intégré dans 80% des cancers liés au VHB (Brechot et al., 1980). Cette intégration semble se faire au hasard et tout le long du génome mais il a été montré qu'une majorité des intégrations se font dans les régions codantes et les promoteurs (Ding et al., 2012). Les conséquences de ces intégration peuvent être multiples. Des études à grande échelle ont pu montrer que l'intégration cible fréquemment dans les régions proches des gènes TERT (*Telomerase reverse transcriptase*) ou des histones méthyltransférase MLL2/MLL4 (MLL : Mixed-Lineage Leukemia) et que ces intégrations proches des gènes TERT (*Telomerase reverse transcriptase*) ou des histones méthyltransférase MLL2/MLL4 (MLL : Mixed-Lineage Leukemia) et que ces intégrations proches des gènes TERT (*Telomerase reverse transcriptase*) ou des histones méthyltransférase MLL2/MLL4 (MLL : Mixed-Lineage Leukemia) et que ces intégrations proches des gènes TERT (*Telomerase reverse transcriptase*) ou des histones méthyltransférase MLL2/MLL4 (MLL : Mixed-Lineage Leukemia) et que ces intégrations proches des gènes TERT (*Telomerase reverse transcriptase*) ou des histones méthyltransférase MLL2/MLL4 (MLL : Mixed-Lineage Leukemia) et que ces intégrations proches des gènes TERT (*Telomerase reverse transcriptase*) ou des histones méthyltransférase MLL2/MLL4 (MLL : Mixed-Lineage Leukemia) et que ces intégrations modifiaient leur expression (Ferber et al., 2003; Tamori et al., 2005). La protéine virale HBx pourrait elle aussi intervenir dans le développement du CHC. II a été montré que la protéine a la capacité

de modifier le déroulement du cycle cellulaire, l'apoptose, certaines voies de signalisation ainsi que les mécanismes de réparation de dommages à l'ADN (Benhenda et al., 2009; Liu et al., 2016b). Dans certains contextes, la protéine peut directement induire des cancers chez la souris (Kim et al., 1991). HBx interagit avec un grand nombre de partenaires protéiques et peut agir à plusieurs niveaux. Elle joue un rôle transactivateur pour l'expression des gènes viraux et son expression induit également l'activation de certains promoteurs et enhancers cellulaires. HBx est capable de modifier l'activité des facteurs épigénétiques qui interviennent sur l'ADN viral, mais qui régulent également l'expression des gènes cellulaires (Hong et al., 2017; Rivière et al., 2015; Zhang et al., 2016). Enfin, HBx possède un domaine de liaison à la protéine DNA damage-binding protein 1 (DDB1) qui fait partie du complexe CuIA/E3 ubiquitin ligase et permet l'ubiquitination de certaines protéines et donc leur dégradation par le protéasome. Par cette interaction, HBx est capable de dégrader spécifiquement certains partenaires et pourrait influer sur le développement de cancers (Decorsière et al., 2016; Livingston et al., 2017).

Transmission

Le mode de transmission du VHB est fortement influencé par la prévalence dans les zones où il est contracté. Dans les zones de forte endémicité, la transmission du virus se fait majoritairement de la mère à l'enfant ou bien par exposition à du sang contaminé pendant l'enfance (Anderson et al., 1975; Beasley et al., 1982). Cependant le virus se retrouve également dans de nombreux fluides corporels (sang, salive, sang menstruel, sécrétions vaginales ou séminales), et peut survivre en dehors du corps pendant plusieurs jours ce qu'il fait qu'il est facilement transmis (Lavanchy, 2004). Dans les régions où la prévalence est plus faible, la contamination vient plus souvent d'un comportement à risque ou bien d'une transmission par du matériel médical contaminé (Liaw and Chu, 2009).

C. Prévention et traitement

La mise au point d'un vaccin composé de particules purifiées à partir de sérum disponible très rapidement après la découverte du virus ainsi que le dépistage systématique du virus avant la transfusion ont permis très tôt de lutter contre la transmission du virus (Maupas et al., 1976). Ce vaccin a ensuite été remplacé par un

vaccin recombinant sous unitaire, produit en levure ou en cellule, considéré comme plus sure (Milich et al., 1985). Il permet de prévenir l'infection chronique dans environ 95% des cas. A l'heure actuelle, d'après l'OMS plus de 150 pays ont inclus ce vaccin dans leur programme de vaccination infantile (Stevens et al., 2017). Afin de diminuer l'incidence du VHB, il est aujourd'hui primordial de prévenir par tous les moyens la transmission périnatale pour les mères séropositives pour HBsAg. Ce risque peut être réduit jusqu'à 90% par administration conjointe à la naissance du vaccin et d'immunoglobulines spécifiques du VHB (Stevens et al., 2017). Dans les zones d'endémicité moyenne à faible, il est aussi préconisé de vacciner les enfants dès leur plus jeune âge et avant l'adolescence. Enfin dans les zones de très faible endémicité, le coût du vaccin peut amener à vacciner seulement les personnes à risques comme le personnel médical (Lavanchy, 2004).

Depuis 3 décennies, les campagnes de vaccination en masse ont déjà porté leurs fruits. La campagne de vaccination de masse menée à Taiwan a par exemple permis de réduire de 10.5 à 1.7% la prévalence de l'HBsAg chez les enfants de moins de 6 ans entre 1989 et 1993, ainsi que de diminuer significativement l'incidence des CHC chez les enfants âgés de 6-14ans (Huang and Lin, 2000). Le vaccin contre le VHB est donc le premier vaccin au monde à prévenir un cancer.

Les traitements actuels de l'infection chronique reposent sur l'utilisation d'IFN- α pégylés et d'analogues de nucléotides/nucléosides. Le traitement à l'IFN- α va agir comme immunomodulateur et permettre par exemple l'activation des macrophages, des cellules NK (*Natural Killer*) et des CTL (Maini and Gehring, 2016). Cependant tous les patients ne répondent pas au traitement par l'IFN- α (Dusheiko, 2013). Les inhibiteurs de nucléosides sont des inhibiteurs enzymatiques de la polymérase virale. Ils vont être incorporés par celle-ci lors de la rétrotranscription et vont agir comme terminateur de chaine nucléotidique. Les traitements par la Lamivudine ont été les premiers analogues de nucléoside approuvés pour le traitement du VHB, mais ils donnent lieu à l'émergence de résistance dans 70% des cas après 4 ans de traitement. Le traitement par l'Adéfovir est lui aussi source de l'émergence d'un grand nombre de mutants résistants. Aujourd'hui ce problème majeur fait qu'il est déconseillé d'utiliser ces inhibiteurs. On préférera alors des traitements avec l'Entécavir (1.2% de résistance après 5 ans de traitement) ou bien encore le Ténofovir pour lequel aucune souche résistante n'a pu être identifié (Lai et al., 2003). Aujourd'hui l'attention et la recherche se tournent vers le développement d'inhibiteurs d'assemblage de la capside, les CpAMs (Core protein Allosteric Modulators) qui sont de deux types. Les HAP (heteroaryldihydropyrimidine derivatives) type I conduisent à la formation de capsides mal assemblées, incapables d'encapsider ou de rétrotranscrire l'ARNpg. Les HAP de type II eux conduisent à la formation de capsides vides (Zhang et al., 2019). La présence de ce type de particule pourrait augmenter l'exposition de certains épitopes de la protéine et donc la reconnaissance par le système immunitaire des cellules infectées en plus d'inhiber l'encapsidation de l'ARNpg et donc la réplication. Plusieurs de ces molécules sont en cours d'essais cliniques.

Les traitements utilisés actuellement permettent de contrôler la réplication virale et d'améliorer les fonctions du foie mais ne permettent pas d'aboutir à une élimination du virus car ils ne ciblent pas l'ADN circulaire covalement clos (ADNccc) qui reste stable dans les cellules infectées, et lors de l'arrêt de ces traitements, on observe généralement un rebond viral. Il est donc important de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour traiter les infections chroniques en ciblant notamment l'ADNccc.

Malgré tout, le dernier rapport de l'OMS sur les hépatites virales est encourageant et annonce vouloir éliminer ces dernières du spectre des menaces publiques en matière de santé pour 2030. En effet avec le développement des traitements et en faisant de la vaccination une priorité dans les zones à risques nous avons aujourd'hui toutes les cartes en mains.

D. Epidémiologie

Les infections par le VHB sont très répandues dans le monde, en effet on estime à environ 2 milliards le nombre de personnes ayant été en contact avec le virus, c'està-dire qu'ils portent les marqueurs d'une infection présente ou passée, soit un peu plus du quart de la population mondiale. En 2015, d'après l'OMS il y avait environ 257 millions de personnes atteintes d'une infection chronique par le VHB soit une prévalence de 5%. EN 2015 toujours, l'OMS indiquait que 887000 personnes étaient décédées des suites d'une infection par le VHB ce qui en fait le deuxième agent pathogène le plus mortel au monde après la malaria.

Il est très important de noter qu'il y a une forte disparité dans la répartition géographique du VHB avec des zones de très faible endémicité comme en Europe de

l'ouest ou aux Etats Unis (0.1-2%) et a contrario, des zones comme l'Afrique subsaharienne ou encore l'Asie du sud-est où le taux de prévalence dépasse les 8% et peut atteindre jusqu'à 20% (Figure 4). En France on dénombre environ 280 000 personnes chroniquement infectées, soit un taux de prévalence de 0,65%.



Figure 4 : Prévalence du VHB dans le monde. (CDC, 2010, tiré de Gupta et al. 2014)

Environ 10-15% des patients infectés par le VHB présentent une co-infection avec le virus de l'hépatite C. Et 5% avec le virus de l'hépatite delta. Ce dernier est considéré comme un virus satellite car il utilise les protéines de surface du VHB et nécessite donc une co-infection ou une surinfection avec le VHB pour se répliquer. Enfin, environ 10% des patients séropositifs pour le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) présentent une co-infection pour le VHB, et que cette co-infection est un facteur aggravant amenant à des complications pour les porteurs chroniques du VHB (Burns and Thompson, 2014).

E. La famille des *Hepadnaviridae :* origine et évolution.

Les *Hepadnaviridae* font partie du groupe VII des familles virales à savoir les virus utilisant un intermédiaire ARN pour se répliquer. Ils forment le groupe des pararétrovirus regroupant des virus qui ont la même structure génétique et la capacité d'infecter des cellules hépatiques. La famille est composée de 2 genres, les *Avihepadnavirus* qui infectent les oiseaux, dont le virus modèle est un virus infectant les canards (DHBV) et les *Orthohepadnavirus* qui infectent les mammifères. Ce dernier genre contient 3 sous-familles, qui infectent respectivement les rongeurs, les chauves-souris et les primates (Figure 5).

La découverte récente de virus appartenant à la famille des hepadnavirus dans prélèvements effectués chez la chauve-souris a permis une avancée majeure dans la compréhension de l'origine du virus infectant l'humain. En effet, en plus de montrer que les chauves-souris étaient infectées par ce virus, Drexler et al. ont montré que le virus se répliquait de façon active chez cet hôte et ont observé des changements histologiques dans le foie, compatibles avec une hépatite. Pour finir, ils ont montré que



Figure 5 : Famille des Hepadnaviridae (Tiré de Littlejohn et al., 2016)

La famille de Hepadnaviridae est sous divisé en deux groupes, les Avihepadnavirus infectant les oiseaux et le Orthohepadnavirus infectants les mammifères. Les lignées des virus de primates s'entrecroisent indiquant un passage inter-espèce entre les virus humains et primates non humains.

ces virus étaient capables non seulement de se répliquer dans des hépatocytes humains lorsque leurs génomes y sont transfectés, mais également que certains de ces virus auraient le potentiel d'infecter les cellules d'origine humaines (Drexler et al., 2013). Ces résultats indiquent que le VHB pourrait avoir une origine zoonotique et apportent une meilleure compréhension des théories évolutives en place jusqu'à lors.

Une étude récente a mis en évidence la présence du VHB dans des ossements humains datant de -800 à -4500 ans. Les génomes ainsi découverts possèdent les mêmes propriétés génétiques que les virus circulants actuels, malgré une répartition géographique différente. Cette étude établie également le lien de phylogénie avec les virus circulants actuels et les virus primates renforçant l'idée d'une co-évolution avec contamination inter espèce et un même ancêtre commun. Cette théorie explique que les arbres phylogénétiques des virus humains et primates soient entrecroisés (Figure 5). L'analyse comparative de ces prélèvements anciens et des virus circulant actuellement chez les primates a permis de recalculer les taux de mutations du virus aboutissant à un chiffre entre 8.04×10^{-6} à 1.51×10^{-5} substitutions par site par an. Il a donc été possible de redéfinir la date d'apparition d'un ancêtre commun de ces virus



Figure 6 : Répartition mondiale des différents génotypes du VHB. (Tiré de Littlejohn et al., 2016)

primates à environ -8600 à -20100 années (Mühlemann et al., 2018).

Aujourd'hui le VHB humain est divisé en 10 génotypes (A-J) qui sont définis par une séquence génétique qui diverge de plus de 8%. Ces génotypes sont repartis de façon distincte sur le territoire comme nous le montre la Figure 6. Au sein des génotypes, une divergence de plus de 4% va donner lieu à des distinctions entre sous génotype. Cela concerne tous les génotypes sauf les génotypes E et H.

F. Structure des particules virales

Les premières observations du VHB en 1970 ont permis de décrire des particules virales enveloppées de 42 nm de diamètre avec une structure interne associée à la capside (Figure 7 panneau du haut). L'infection par le VHB conduit également à la sécrétion de particules virales défectives qui se retrouvent soit sous la forme de filaments, soit de sphères de plus petite taille que le virus d'environ 17-22nm de diamètre. Ces particules sont dépourvues de capside et d'ADN, constituées de l'enveloppe virale seulement et sont produites dans le contexte naturel de l'infection à une concentration 100-1000 fois plus élevée que les particules infectieuses (Figure 7, panneau du bas) (Dane et al., 1970).

L'enveloppe virale est constituée d'une bicouche lipidique enrichie en cholestérol et des protéines virales de surface S-HBs, M-HBs et L-HBs (pour Small, Middle et Large HBs) qui sont ancrées dans cette bicouche lipidique (Gavilanes et al., 1982). La protéine S-HBs est présente en plus grande proportion sur la surface des virions (Heermann et al., 1984). Cette enveloppe protéique contient une capside icosaédrique composée de 120 dimères de la protéine de capside HBc (T=4) bien que l'on retrouve en plus faible proportion des capsides composées de 90 dimères avec une symétrie T=3 (Crowther et al., 1994; Zlotnick et al., 1999). La structure cristallographique de la capside de conformation T=4 a été résolu en 1999 (Wynne et al., 1999). Cette capside contient l'ADN viral partiellement double brin lié de façon covalente à l'ADN polymérase virale (HBV pol) (Figure 7). Il a également été rapporté des particules moins denses aux électrons lors des observations au MET qui sont associées à des particules virales défectives pourvues d'enveloppe et de capsides mais dépourvues d'ADN viral (Kaplan et al., 1976). Des protéines cellulaires peuvent également être encapsidées comme la protéine kinase de type C, ayant un rôle sur la phosphorylation de la capside après encapsidation de l'ARNpg (Kann and Gerlich, 1994), ou la DNase I dont l'encapsidation aboutirait à la dégradation de l'ADN virale et serait associée à un mécanisme de défense cellulaire (Hallez et al., 2019).

G. Génome du VHB

La particule virale contient un génome d'environ 3,2kb qui est sous la forme d'un ADN partiellement double brin appelé ADN-RC pour ADN Relâché Circulaire. Les deux brins du génome sont de tailles différentes et maintenus ensemble par leurs extrémités 5' cohésives (Summers et al., 1975). Cette région contient les deux séquences DR1 et DR2 qui sont nécessaires pour la réplication du virus. Le brin (-) le plus long est complet, alors que le brin (+) est incomplet par son extrémité 3' avec une taille variable allant de 50 à 100% du génome viral (Figure 8). L'ADN polymérase



Figure 7 : Structure du VHB.

A) représentation schématique d'un virion, constitué d'une enveloppe lipoprotéique avec les trois protéines virales L-HBs, M-HBs et S-HBs, qui entoure une capside virale icosaédrique de conformation T=4 contenant le génome. Ce génome est partiellement double brin et covalemment lié à la polymérase virale. (Tiré de ViralZone) B) Observation au MET des particules virales et sous-virales. Les flèches représentent les trois types de particules produites à savoir la particule de Dane (flèche du haut), les particules filamentaires ou sphériques de plus petites tailles. (Phototèque Institut Pasteur)

virale est liée covalemment à l'extrémité 5' du brin (-) du génome et l'extrémité 5' du

brin (+) est lié à une amorce ARN d'environ 19 nucléotides venant de l'ARNpg ayant servi d'amorce pour sa synthèse (Figure 8).

Du fait de sa petite taille, le génome du VHB subit de fortes contraintes. De ce fait, les régions codant les différentes protéines virales mais également les régions régulatrices sont chevauchantes. Le génome possède 4 cadres de lecture ouverts (ORF : Open Reading Frame) qui permettent l'expression de 7 protéines virales. L'ORF preC/C va permettre l'expression de la protéine de capside HBc et de la



Figure 8 : Organisation génomique de l'ADN-RC et transcrits viraux. (Tiré de ViralZone)

Le génome contenu dans les particules virales est circulaire et relâché, partiellement double brin (ADN RC). Les gènes viraux ainsi que les éléments régulateurs se chevauchent dans le génome. Ce génome permet la synthèse de 5 ARN viraux, dont l'ARNpg qui va servir de matrice à la réplication du virus. Le génome code pour 7 protéines. protéine sécrétée HBe. L'ORF P code pour l'ADN polymérase virale. L'ORF S va permettre l'expression des trois protéines virales L-HBs, M-HBs et S-HBs. L'ORF X va permettre d'expression de la protéine régulatrice HBx (Figure 8).

En plus de ces régions codantes et de leurs promoteurs respectifs, plusieurs autres séquences régulatrices ont été décrites. On retrouve tout d'abord un signal de polyadénylation, qui est commun pour tous les ARN viraux. Il est a noter que ce signal de polyadénylation est ignoré une première fois lors de la transcription des ARNpg et PreC/C. Le génome viral comprend deux enhancers (I et II), dont les rôles respectifs seront détaillés plus tard. En amont du promoteur precore/core nous retrouvons la présence d'un élément de régulation négatif qui régule l'expression de cet ARN. Enfin le génome contient également une région PRE (Post-transcritpional Regulatory Element), qui va permettre de réguler l'export, l'épissage et la stabilité des ARN viraux (Figure 8).

H. Protéines virales

1. Les protéines d'enveloppe HBs

Les trois protéines d'enveloppes sont exprimées à partir de deux ARN différents. L'ARN preS1, long de 2,4kb, va permettre la traduction de la protéine L-HBs et l'ARN preS2/S de 2,1kb va permettre l'expression des protéines S-HBs et M-HBs. Les protéines sont présentes à la surface des particules virales S-HBs, M-HBs et L-HBs à un ratio de 4:1:1 (Heermann et al., 1984). Les trois protéines sont exprimées à partir d'un codon initiateur propre à chacune mais partagent une même extrémité COOH-terminale (C-ter) commune. Le domaine S est commun aux trois protéines, le domaine PréS2 est commun aux protéines L et M et le domaine PréS1 est seulement présent sur la protéine L-HBs (Figure 9A). Les trois protéines sont traduites au niveau du réticulum endoplasmique (RE) et vont être ancrées dans sa membrane par plusieurs domaines transmembranaires. Leur rôle est primordial car elles permettent l'entrée du virus dans la cellule en interagissant avec son récepteur le Sodium tauchlorate co-transporting polypeptide (NTCP) via la protéine L-HBs (Yan et al., 2012).

La protéine S-HBs est une protéine de 226 acides aminés (AA) de 24kDa qui possède seulement le domaine S des protéines d'enveloppe. Ce domaine est intégré à la membrane du réticulum endoplasmique (RE) de façon concomitante à sa

traduction. 4 domaines transmembranaires sont suspectés (TM1 – TM4) et une boucle est formée entre TM2 et TM3 formant le déterminant antigénique majeur de l'enveloppe (Figure 9B). La protéine porte un site de glycosylation qui est facultatif. Des mutations de ce site de glycosylation vont entrainer une diminution de la sécrétion des particules de Dane, bien qu'elles ne semblent pas avoir d'impact sur la sécrétion des particules sous-virales. C'est la protéine retrouvée majoritairement à la surface des particules de Dane et également des particules sous-virales.

La protéine M-HBs est une protéine de 281 AA. Elle possède le domaine PreS2 à son extrémité NH₂-terminale (N-ter) qui n'est pas présent pour la protéine S-HBs. Ce domaine n'est pas ancré dans la membrane et sera retrouvé dans la lumière du RE. En plus du site de glycosylation facultatif présent dans le domaine S, la protéine porte deux autres sites de glycosylation. Une N-glycosylation de l'AA4 qui est toujours retrouvée et un site de O-glycosylation qui est retrouvé différemment suivant les génotypes et pourrait être associé à l'échappement viral (Tai et al., 2002). La protéine M-HBs est retrouvée seulement sur les particules de Dane et sur les particules virales sous filamentaires dans la même proportion que la protéine L-HBs. Bien que cette protéine soit très conservée dans la famille des Orthohepadnavirus son rôle est encore mal compris et elle ne semble pas indispensable à la sécrétion ou à l'entrée du virus et n'est d'ailleurs pas exprimée chez le DHBV (Bruss and Ganem, 1991). De récents travaux ont cependant montré qu'elle pourrait jouer un rôle dans la sécrétion virale. (Zhao et al., 2018).

Enfin la protéine L-HBs possède le domaine PreS1 d'une taille de 108 à 119AA, suivant les génotypes, qui est placé en N-ter du domaine PreS2. Ce domaine est modifié post-traductionnellement à son extrémité N-Ter par myristoylation ce qui permet son ancrage dans la membrane. Le domaine PréS1 peut être exposé dans la lumière du RE ou bien dans le cytosol. Ces deux conformations ont un rôle spécifique : lorsque le domaine est exposé dans le cytoplasme, il va pouvoir interagir avec la capside virale jouant un rôle indispensable à l'enveloppement des capsides et à sécrétion des particules virales. Lorsque ce domaine est exposé dans la lumière du RE, et donc par la suite à l'extérieur de la particule virale après sécrétion, il va pouvoir interagir et reconnaitre le récepteur NTCP du virus par ses AA 2-48 (Yan et al., 2012). Les travaux de Seitz et al. ont montré que lorsque les virions étaient sécrétés, le domaine PréS1 était préférentiellement exposé à l'intérieur du virion, et que ce dernier subissait une maturation post sécrétion permettant le changement de conformation et



Figure 9 : Structure des protéines de surface et ancrage de ces protéines à la membrane du RE.

A) Structure des trois protéines de surface. Les trois protéines possèdent le domaine S, les protéines M-HBs et L-HBs possèdent le domaine pres2 en N-ter du domaine S et la protéine L-HBs possède le domaine preS1 en N-ter du domaine preS2 qui sera myristoylé en N-ter. Celui-ci porte la boucle permettant la liaison au récepteur viral. **B)** Ancrage des protéines de surface dans la membrane du RE. Le domaine S de la protéine est ancré par 4 domaines transmembranaires. Le domaine preS2 se trouve dans la lumière du RE. Le domaine preS1 peut se retrouver dans 2 conformations, vers l'intérieur cytoplasme afin de se lier à la capside, ou tournée vers la lumière du RE, et donc à l'extérieur du virion après sécrétion afin de permettre la liaison au récepteur. (Adapté de Seitz et al., 2016)

l'exposition du domaine à l'extérieur des capsides et donc la liaison avec le récepteur (Seitz et al., 2016).

De façon très intéressante, les particules de Dane ainsi que les particules sousvirales filamentaires possèdent les trois protéines de surface, mais les particules sousvirales sphériques n'expriment pas la protéine M-HBs à leur surface. Ce résultat indique que les particules ne suivent pas les mêmes voies de sécrétions (Heermann et al., 1984). Les travaux ont montré que les particules exprimant les trois protéines de surface sont sécrétées par une voie qui fait intervenir les complexes ESCRT (Endosomal sorting complexes required for transport) ainsi que les corps multivésiculaires (Lambert et al., 2007; Watanabe et al., 2007).

2. La protéine de capside HBc.

La protéine HBc est une protéine de 21kDA et de 183 AA qui est exprimée à partir de l'ARNpg. Cette protéine de capside joue un rôle essentiel dans la réplication virale en permettant notamment l'encapsidation de l'ARNpg, la formation des capsides, la rétrotranscription et le relargage uniquement des particules matures. Elle est constituée par deux domaines liés par un linker (Figure 10).

Le domaine N-ter constitué des AA 1-140 constitue le domaine d'assemblage des capsides et joue un rôle structural. Ce domaine est suffisant pour la formation de capside et sa structure cristallographique a été résolue (Wynne et al., 1999). Il est constitué de 5 hélices-α connectées par des boucles. L'assemblage des monomères



Figure 10 : Structure de la protéine HBc, des dimères et des capsides virales.

A) La protéine HBc est constituée de 3 domaines. Le domaine de dimérisation en N-ter permet la formation des capsides. Le domaine C-ter riche en arginine permet la liaison aux acides nucléiques et porte de nombreuses sérines phosphorylables permettant de réguler les étapes tardives du cycle de réplication. B) Représentation d'un dimère d'HBc (HBc 1-149). Les boucles 3 et 4 permettent l'association des deux dimères, formant un pic. Les boucles 1, 2 et 5 forment la base du dimère. (Venkatakrishnan and Zlotnick, 2017) C) assemblage des dimères pour former les capsides de conformation T=4. (Wynne et al., 1999)

d'HBc en dimère va se faire entre les hélices 3 et 4 de chacun des monomères respectifs et va former une structure de 4 boucles. Un pont disulfure peut se former entre les cystéines 61 de l'hélice 3 de chacun des monomères bien que ce pont ne soit pas nécessaire à la formation des capsides. Les hélices 1, 2 et 5 vont former la base du dimère (Figure 10B). Les dimères vont ensuite s'assembler pour former une entité asymétrique constituée de deux dimères AB et CD et former les capsides de conformation T=4 comptant 120 dimères dans 95% des cas (Crowther et al., 1994; Wynne et al., 1999). La tyrosine 132 qui se trouve à l'extrémité de l'hélice 5 joue un rôle primordial dans l'assemblage des capsides et la mutation Y132A, va inhiber l'assemblage des dimères en capside. Le pic formé par les 4 boucles du dimère va se trouver à l'extérieur de la capside et entrer en contact avec les protéines de surface (Figure 10C).

Le domaine C-Ter (CTD) est compris entre les acides aminés 150-183 et va avoir un rôle régulateur dans les étapes finales de la réplication. Il n'est pas nécessaire pour la formation des capsides et se trouve à l'intérieur de la capside, en contact avec l'ARNpg (Wang et al., 2012). Plusieurs régions importantes ont été mises en évidence. Cette extrémité contient en effet les 4 domaines riches en arginine (I-IV) qui permettent la liaison aux acides nucléiques ainsi que de nombreux résidus phosphorylables qui vont permettre de réguler finement les étapes d'encapsidation, de liaison aux protéines membranaires et d'import au pore nucléaire (NPC : Nuclear pore complex) (Figure 10A). Les sérines S155, S162 et S170 qui appartiennent à des sites spécifiques et conservés SPRRR, sont les sites de phosphorylation majoritaires, mais des phosphorylations sur les résidus S168, S176 et T160 ont également été décrites (Jung et al., 2014; Lan et al., 1999; Melegari et al., 2005). Lorsque le CTD se trouve sous une forme hypo-phosphorylé, il est incapable d'encapsider l'ARNpg. Cependant une hyper-phosphorylation va entrainer une inhibition de la synthèse de l'ADN RC. Les phénomènes de phosphorylation sont donc très importants, finement régulés et dynamiques. Les kinases SRPK 1 et 2 (SR protein-specific kinase) ainsi que Cdk2 (cyclin dependent kinase 2) sont capables de phosphoryler spécifiquement les sites du CTD et peuvent se retrouver encapsidées (Ludgate et al., 2012). De plus récents travaux ont montré que la kinase PLK1 (Polo-like-kinase 1), dont l'expression et l'activation sont augmentées dans les cellules infectées, est un facteur proviral qui permet la phosphorylation des sites S168, S176 et S178 de façon spécifique. L'étude montre également que la phosphorylation de ces sites dépend de la phosphorylation préexistante des sérines S155, S162, et S170 indiquant que ces phosphorylations se font de manière ordonnée. La protéine HBx semble jouer un rôle sur la phosphorylation d'HBc, notamment en activant PLK1 (Diab et al., 2017; Melegari et al., 2005). La phosphorylation du CTD permet des changements de conformation et peut amener à l'exposition de certains épitopes à l'extérieur de la capside (Kann and Gerlich, 1994).

Entre ces deux domaines se trouve une région *linker* qui a longtemps été supposée comme une région inerte permettant seulement de connecter les deux domaines. Cependant des travaux récents de mutagenèse ont montré qu'il était nécessaire aux différentes étapes tardives du cycle viral. Les délétions complètes ou bien de la partie C-ter du *linker* vont diminuer l'efficacité d'encapsidation de l'ARNpg, et la rétrotranscription va également être également sévèrement impactée. Les délétions de la région N-ter de ce domaine vont en revanche affecter la sécrétion des particules vides (Liu et al., 2018a).

Les mécanismes de phosphorylation du CTD vont également avoir un impact sur la localisation d'HBc. Le CTD contient les signaux d'import nucléaire (NLS) et les signaux d'export nucléaire (NES) qui permettent l'import des capsides jusqu'au noyau et également le transit de la protéine entre le noyau et le cytoplasme (Li et al., 2010). Il a été montré que la protéine possède une localisation à la fois cytoplasmique et nucléaire et que dans le noyau des cellules infectées, HBc se trouve présent sur l'ADNccc. Son rôle dans ce contexte sera détaillé dans le chapitre 4 de cette introduction.

3. HBV pol : la polymérase virale

Le VHB code pour sa propre polymérase, HBV pol qui est exprimée à partir de l'ARNpg. Il s'agit d'une protéine de 90kDa qui permet la synthèse de l'ADN RC à partir de l'ARNpg grâce à son activité de transcriptase inverse (RT). Pour cela elle possède trois activités enzymatiques. Tout d'abord une activité ADN polymérase ARN dépendante, afin de permettre la synthèse du brin (-) de l'ADN RC à partir de l'ARNpg. Ensuite une activité RNase H, qui va dégrader l'ARNpg de manière simultanée à la rétrotranscription. Et enfin une activité ADN polymérase ADN dépendante, qui va permettre la synthèse du brin (-). En parallèle de ces activités enzymatiques, HBV Pol joue un rôle dans la reconnaissance et la fixation à la séquence ε de l'ARNpg, dans l'encapsidation de l'ARNpg et également un rôle dans le mécanisme inédit d'amorçage protéique pour la synthèse du brin (-) de l'ADN RC
(Bartenshlager 1990, Hirsh 1990). La protéine HBV Pol a une structure différente des RT trouvé pour les autres rétrovirus, en effet elle est formée de 4 domaines : le domaine terminal de la protéine (TP) et le domaine *spacer* qui sont des caractéristiques uniques aux polymérases des hepadnavirus, et le domaine polymérase/reverse transcriptase (Pol/RT) et le domaine RNase H qui ont une séquence similaire et conservée par rapport aux autres RT. Le domaine TP porte la tyrosine 63 qui est indispensable à l'amorçage protéique pour la production du brin (-) et va être covalemment lié à l'extrémité 5' du brin (-) (Zoulim & seeger 1994). La fixation à la séquence ε est réalisée par ce domaine ainsi que le domaine Pol/RT (Figure 11). Le *spacer* qui se trouve entre les deux permet à l'enzyme d'avoir une certaine flexibilité. Le domaine polymérase contient un motif YMDD qui est un motif typique d'une RT, il est donc présent dans tous les génotypes. Le domaine RNAseH permet la dégradation de l'ARNpg lors de la synthèse du brin (-) mais également l'amorçage du brin (+) avec l'ARNpg.

Du fait de sa liaison covalente à l'ADN-RC elle a été suspectée pendant longtemps d'avoir un rôle sur la formation de l'ADNccc. Cependant des travaux ont montré que la formation de l'ADNccc dépend majoritairement des ADN polymérases cellulaires (Qi et al., 2016).



Figure 11 : Structure de la polymerase virale, HBV pol. .

La protéine HBV Pol est formé par un domaine terminal (TP) impliqué dans l'amorçage de la synthèse de l'ADN RC.Le domaine RT possède l'activité enzymatique d'ADN polymérase ADN et ARN dépendant. Un linker permet d'établir une connexion flexible entre ces deux premiers domaines. Enfin le domaine C-ter RNase H va permettre la dégradation de l'ARNpg après retrotranscritpion.

Lors de l'apparition de mutations de résistance avec les traitements à base d'analogues de nucléotides, c'est la polymérase qui va porter les mutations. Il est alors possible de retrouver des mutations sur le motif YMDD, ce qui diminue l'efficacité de réplication du virus, mais ces mutations sont généralement associées à d'autres mutations compensatoires.

4. L'antigène HBe

L'ORF precore/core possède un second codon initiateur en amont de celui codant pour HBc, en phase avec ce dernier, et va générer la protéine P25, modifiée post traductionnellement pour donner la protéine HBe. S'ils sont produits à partir du même cadre de lecture, les deux protéines ne sont pas exprimées à partir du même ARN. L'ARN permettant l'expression de P25 est lui plus long que l'ARNpg.

HBc et P25 partagent la même extrémité C-ter. Mais la protéine précore va être adressée au RE du fait de la présence à son extrémité N-ter d'un peptide signal. Ce peptide signal sera clivé lors de la translocation de la protéine dans le RE donnant la



Figure 12 : Synthèse de la protéine HBe.

Lors de sa traduction, la protéine P25 va être adressée et transloquée dans le RE grâce à son peptide signal. Les 10 premiers acides aminés de ce peptide signal vont être clivés, donnant la protéine P22. Celle-ci va être transportée vers le trans-golgi pour être de nouveau clivée par une furine donnant la protéine sécrétée HBe.

protéine P22 qui possède à son extrémité N-ter 10AA de plus qu'HBc. P22 est ensuite modifiée dans le trans-golgi où une furine va cliver les 34 derniers AA de l'extrémité C-ter (domaine riche en arginine), aboutissant à la forme sécrétée de la protéine HBe de 17kDa (Figure 12). Dans le sérum des patients infectés, la protéine est trouvée sous forme de dimère. La protéine est également capable de former des capsides cependant celles-ci sont dépourvues d'ARN du fait de l'absence du CTD et ce sont très instables du fait de la présence à l'extrémité N-ter des 10AA supplémentaire par rapport au domaine de dimérisation d'HBc.

Le rôle de la protéine HBe est encore mal compris. Il s'agit d'une protéine accessoire à la réplication du virus. Cependant des travaux ont montré qu'elle jouait un rôle important dans l'histoire naturelle de l'infection. Elle pourrait jouer un rôle dans l'évasion immunitaire en diminuant la reconnaissance de l'antigène HBc dans la cellule (Milich et al., 1998). De façon intéressante, la protéine P22, peut être rétro-transloquée dans le cytoplasme (15% de la protéine environ) et serait capable de former des dimères hybrides avec HBc, séquestrant cette protéine dans le cytoplasme et réprimant donc la réplication virale. Ainsi P22 à un rôle immunomodulateur et pourrait jouer un rôle dans la persistance virale (Scaglioni et al., 1997). La protéine P22 a également été retrouvée dans les capsides provenant de sérums de patients infectés chroniquement. Chez de nombreux patients infectés de façon chronique, le virus présente un promoteur précore muté et donc atténué voire inactivé et n'exprime plus la protéine.

5. La protéine régulatrice HBx

Les hepadnavirus infectants les mammifères expriment également la protéine régulatrice HBx de 154AA pour environ 17kDa. Elle n'est pas exprimée chez les avihepdnavirus. Il s'agit de la seule protéine régulatrice exprimée chez les hepadnavirus et permet de réguler positivement la réplication du virus. L'expression de la protéine est essentielle pour la réplication virale et les études ont montré que les virus déficients pour l'expression d'HBx sont très peu réplicatifs en culture cellulaire, tout comme lors d'infections de souris ayant des foies humanisés. Ce défaut peut être



Figure 13 : Structure de la protéine HBx.

La protéine HBx est composé de deux domaines, un domaine N-ter de régulation négative (NRD) et un domaine de transactivation. Ce dernier possède plusieurs éléments importants impliqués dans la transactivation nucléaire, la transduction de signaux, sa stabilité, la fixation à DDB1 et au protéasome. 25

restauré par transcomplémentation par la protéine HBx (Lucifora et al., 2011; Rivière et al., 2015; Tsuge et al., 2010).

La protéine est organisée en deux domaines : le domaine de régulation négative et le domaine transactivateur. Le domaine de régulation négative est constitué par les 50 premiers acides aminés et réprime l'activité transactivatrice d'HBx (Murakami et al., 1994). Le domaine de transactivation se trouve entre les acides aminés 53 et 142. Ce domaine contient les régions régulatrices qui permettent de définir les rôles de la protéine. On retrouve une région impliquée dans la transactivation des gènes, une région impliquée dans la transduction des signaux, un domaine de liaison à DDB1, un domaine de liaison au protéasome ainsi qu'un domaine de localisation nucléaire. L'extrémité C-ter est impliquée dans la stabilité de la protéine (Figure 13).

Les travaux donnent des avis divergents quant à la localisation cellulaire de la protéine. Elle a été montrée parfois nucléaire, parfois cytoplasmique ou bien présente dans les deux compartiments (Henkler et al., 2001; Hoare et al., 2001; Su et al., 1998). Les études semblent montrer que la localisation de la protéine dépend en fait de son niveau d'expression. Quand la protéine est exprimée faiblement, HBx se trouve préférentiellement dans le noyau alors que lors de la surexpression de la protéine, elle présentera une localisation cytoplasmique (Henkler et al., 2001). La localisation nucléaire d'HBx est essentielle, et les travaux ont montré que la réplication des virus déficients pour HBx peut être restaurée en re-exprimant une protéine HBx spécifiquement adressée au noyau (Keasler et al., 2009).

La protéine HBx modifie l'expression de nombreuses voies de régulation cellulaire via ses nombreux partenaires protéiques qui ont été décrit (Benhenda et al., 2009). La protéine virale agit notamment sur les voies régulant le cycle cellulaire en favorisant la transition des cellules quiescentes vers les phases de prolifération, notamment par l'activation des voies de transduction de signal Src et Ras (Benn and Schneider, 1995; Bouchard et al., 2001; Koike et al., 1994). HBx interagit avec le surpresseur de tumeur P53 et inactive la transcription des gènes régulés par ce facteur, incluant des gènes du cycle cellulaire, de l'apoptose et des mécanismes de réparation à l'ADN (Link and Iwakuma, 2017; Truant et al., 1995). Il a également été reporté que l'expression d'HBx pouvait induire ou inhiber l'apoptose selon les contextes (Rawat et al., 2012). Par ces mécanismes, HBx pourrait être impliquée dans les processus de tumorigenèse.

La présence de la protéine HBx est essentielle pour activer la transcription des gènes viraux (Keasler et al., 2007). La protéine HBx ne se fixant pas directement à l'ADNccc, cette régulation passe par une interaction avec de nombreux facteurs de transcription (TFIIB, TBP, TFIIH, CREB, c/EBP, NF-IL-6, CBP/P300). Cette capacité transactivatrice va également avoir un impact sur l'expression des gènes cellulaires et peut être impliqué dans le développement des tumeurs associés au VHB (Benhenda et al., 2009; Cougot et al., 2007). La présence d'HBx lors de l'infection permet de produire un environnement épigénétique actif sur la chromatine qui constitue l'ADNccc (Belloni et al., 2009; Rivière et al., 2015).

La protéine HBx interagit avec DDB1. Cette protéine fait partie du complexe Cul4/E3 ubiquitine ligase permettant d'ubiquitiner les protéines afin d'induire leur dégradation par le protéasome. Par cette interaction, HBx peut donc spécifiquement dégrader certains partenaires (Bontron, 2002; Hodgson et al., 2012; Leupin et al., 2005). En présence d'HBx, il a été montré que l'ADNccc était associé à des marques épigénétique actives (Belloni et al., 2009; Rivière et al., 2015). Cependant il a été montré que la régulation épigénétique par HBx n'affectait pas les génomes viraux intégrés (Breugel et al., 2012). Cela est expliqué par la dégradation spécifique du complexe Structural Maintenance of Chromosomes protein 5/6 (SMC5/6) par HBx via sa liaison avec DDB1. Le complexe est impliqué dans la reconnaissance et la répression de l'expression des ADN épisomiques comme l'ADNccc mais pas des gènes cellulaires. Dans un contexte d'infection par du virus déficient pour HBx, l'extinction de l'expression du complexe SMC5/6 par HBx serait donc un pilier majeur de l'activité transactivatrice d'HBx (Decorsière et al., 2016).

Bien que le rôle direct d'HBx dans le processus tumoral soit toujours sujet à débat, il a été montré que dans certaines tumeurs présentant des intégrations virales, des formes tronquées d'HBx peuvent être retrouvées et que celles-ci peuvent avoir perdu leurs propriétés transactivatrices ou antiprolifératives pouvant amplifier le processus tumoral (Sirma et al., 1999).

6. La protéine HBSP

Le virus de l'hépatite B exprime majoritairement ses protéines à partir d'ARNm non épissés. Cependant des formes épissées des ARN viraux sont décrit, notamment l'ARN SP1 de 2,2kb, épissé à partir de l'ARNpg. La proportion de cet ARN peut atteindre jusqu'à 30% de la proportion d'ARNpg dans la cellule (Terré et al., 1991). Cet ARN épissé va permettre l'expression de la protéine HBSP de 93AA avec une extrémité N-ter commune à HBV pol (46AA) et une extrémité C-ter qui correspond à une nouvelle séquence d'acides aminés se trouvant sur un autre cadre de lecture que celui des protéines virales (Figure 14). La protéine a été mise en évidence dans des prélèvements de patients et les travaux qui ont suivi ont mis en évidence la présence d'anticorps dirigés contre la protéine chez 46% des patients chroniquement infectés (Soussan et al., 2000, 2003). Ces études ont montré que la présence d'HBSP était associée à la réplication virale avec la présence d'ADN viral et d'HBeAg dans les sérums et pouvait également être associée à une progression sévère de la fibrose hépatique. Il a été montré que la présence de la protéine est associée à un niveau élevé de TNF-α qui est une cytokine impliquée dans la réponse immunitaire et la



Figure 14 : Synthèse de la protéine HBSP.

La protéine HBSP est exprimée à partir de la forme épissée de l'ARNpg et depuis le codon d'initiaiton de HBV Pol. La protéine traduite possède les 46 premiers acides aminés de la protéine HBV pol et une extrémité C-ter exprimée a partir d'un autre cadre de lecture. régénération du foie. La protéine jouerait un rôle en modulant l'activation de la voie nuclear factor-kappa B (NFκB) après induction par le TNF-α et pouvais avoir un impact sur la régulation des voies apoptotiques (Pol et al., 2015). Plusieurs études ont montré que la proportion de formes épissées augmentait avec l'aggravement des symptômes du patient et la progression vers le CHC, entrainant une augmentation de l'expression de la protéine HBSP. Les études plus récentes ont montré qu'elle pourrait agir sur la tolérance immunitaire en diminuant le recrutement des macrophages et monocytes et donc en diminuant l'inflammation (Duriez et al., 2017). Enfin bien que les premiers travaux aient montré que la protéine pouvait induire l'apoptose des cellules, des travaux plus récents ont montré que la voie apoptotique médiée par Fas/FasL était partiellement inhibée par HBSP induisant une baisse de la sensibilité des cellules HepG2 exprimant stablement HBSP (Soussan et al., 2000; Wu et al., 2018).

2. <u>Réplication du VHB</u>

Le virus de l'hépatite B va infecter principalement les hépatocytes. Après attachement à son récepteur spécifique, le NTCP, le virus va être endocyté puis la nucléocapside contenant le génome viral sous forme d'ADN RC va être libérée dans le cytoplasme. Cette capside sera ensuite transportée par les microtubules jusqu'au NPC. Dans le NPC, la capside va se dissocier afin de libérer l'ADN RC dans le noyau. Une fois dans le noyau, l'ADN RC va être converti en ADNccc, qui existe sous la forme d'un minichromosome avec des protéines histones et non histones, ainsi que la protéine HBc. Cet ADNccc sert de matrice à la transcription des ARN viraux, dont l'ARNpg.

Dans le cytoplasme, l'ARNpg va être reconnu par la polymérase virale, HBV Pol, afin d'être encapsidé puis rétrotranscrit en ADN RC. L'ADNccc du VHB ne possède pas d'origine de réplication, le virus utilise donc d'autres stratégies afin de maintenir son pool d'ADNccc. Un des mécanismes est le recyclage des particules matures contenant l'ADN RC du cytoplasme vers le noyau. La majorité des capsides vont néanmoins être adressées à l'appareil de Golgi où elles vont acquérir une enveloppe puis être sécrétées. Des particules sous-virales, composées seulement des protéines d'enveloppe sont également sécrétées en grand nombre.



Figure 15 : Cycle viral du VHB.

Le virus de l'hépatite B entre dans la cellule par endocytose après attachement à son recepteur le NTCP. Après libération de la capside dans le cytoplasme, celle-ci sera transportée jusqu'au noyau ou l'ADN RC sera délivré pour être converti en ADNccc. L'ADNccc se trouve dans le noyau sous la forme d'un minichormosome avec des protéines histones et non histones, et la protéine HBc. Il va permettre la synthèse des ARN viraux dont l'ARNpg qui va être reconnu par la polymérase puis encapsidé afin d'être rétrotranscrit en ADN RC. Les capsides matures vont ensuite soit être recyclées vers le noyau afin de maintenir le pool d'ADNccc ou bien être envoyée vers le RE pour être enveloppé et sécrétées. (Adapté de Kim et al. 2016)

A. Entrée du VHB dans les hépatocytes.

L'étude des mécanismes de réplication, et particulièrement d'entrée du VHB, a longtemps été ralentie du fait de l'absence de modèles cellulaires adapté. Le récepteur du virus étant inconnu jusqu'en 2012, les seuls modèles cellulaires permissifs à l'infection étaient les hépatocytes primaires humains, les cellules HepaRG

différenciées et les hépatocytes primaires de Tupaïa. Néanmoins, grâce à l'utilisation de ces modèles ou par comparaison avec les virus de mammifères proches (notamment avec le virus de la marmotte) il a été établi très tôt que l'infection par le virus était hautement spécifique des cellules hépatiques, et que cette entrée était médiée par les protéines de surface S-HBs et surtout L-HBs. Le virus va tout d'abord reconnaitre les protéoglycanes à héparane de sulfate (HSPG) par l'intermédiaire de la boucle antigénique de la protéine S-HBs notamment par l'intermédiaire des AA R122 et K141 (Sureau and Salisse, 2013). Les liaisons de la protéine de surface avec les HSPG sont faibles individuellement, mais étant donné que la proportion d'HBs est élevée à la surface du virion, ces interactions permettent au virus une adhésion suffisante pour reconnaitre et interagir par la suite avec le récepteur.

La liaison entre S-HBs et HSPG est donc nécessaire mais pas suffisante. En effet, le virus interagit ensuite avec son récepteur le NTCP (Yan et al., 2012). Il s'agit d'un transporteur des sels et des acides biliaires qui est majoritairement exprimé dans le foie. La protéine NTCP est très conservée chez les mammifères, mais une variation dans la séquence primaire existe, expliquant les barrières d'espèce observée pour les différentes souches virales. Avant la découverte du récepteur viral, il était admis que l'entrée du virus et la reconnaissance du récepteur étaient médiées par la protéine L-HBs. Les études ont montré que l'interaction avec ce récepteur est médiée par les 75 résidus N-terminaux de la protéine L-HBs, et que la myristoylation de cette extrémité est nécessaire (Blanchet and Sureau, 2007). La protéine L-HBs interagit avec les résidus 157-165 du NTCP afin de médier l'entrée du virus dans la cellule (Yan et al., 2012). La myristoylation est l'ajout d'un acide gras couplé à un résidu aminé sur une glycine, dans le cas de du domaine préS1 sur le deuxième AA de la chaine. Ces recherches ont abouti à la production d'un inhibiteur, le Myrcludex B, composé des premiers 47AA du domaine préS1 myristoylé qui est spécifique pour le VHB mais aussi pour le virus delta qui utilise l'enveloppe du VHB (Gripon et al., 2005; Volz et al., 2013).

Il est très probable que comme observé pour les autres virus, la fixation à l'HSPG ou bien au NTCP provoque des changements conformationnels de la membrane induisant l'entrée du virus mais les détails de cette entrée sont encore mal compris. Le virus entre dans la cellule par endocytose. Plusieurs mécanismes ont été évoqués et semblent différer selon le type cellulaire utilisé. L'endocytose médié par la Cavéoline1 a été suspectée en cellules HepaRG bien que les inhibiteurs spécifiques de cette voie d'entrée n'aient que très peu d'effet. Il semblerait que la voie d'entrée soit

clathrine dépendante. La protéine de surface L-HBs interagit spécifiquement avec la chaine lourde de la clathrine ainsi qu'avec la protéine AP-2 qui est un adaptateur protéique des complexes associés aux clathrines, et l'extinction de l'expression de ces deux partenaires inhibent l'entrée du virus (Huang et al., 2012). De plus les inhibiteurs de la voie d'endocytose clathrine dépendante inhibent l'entrée du virus (Huang et al., 2014; Umetsu et al., 2018).

A la suite de son endocytose le virus suit la voie endo-lysosomale afin de permettre la libération de la capside dans le cytoplasme. La libération de la capside ne semble pas dépendre de l'acidification des vésicules car les composés augmentant le pH des endosomes n'ont aucun impact sur la libération du virus. De plus, il semble que les capsides virales internalisées sans enveloppe soient également transportées aux lysosomes (Cooper and Shaul, 2006). La voie lysosomal pourrait permettre une maturation finale des capsides, permettant leur import au noyau par la suite. Ces résultats sont pourtant soumis à controverses car des études récentes ont mis en évidence une activité fusogénique du domaine préS1 (AA 9-34) dépendante d'un abaissement du pH. Ces résultats ont cependant été mis en évidence dans un contexte non-infectieux (Liu et al., 2016a; Somiya et al., 2015). Une autre hypothèse est la présence dans le domaine préS2 d'un motif de translocation membranaire (TLM) formant une hélice α et aidant à la translocation du virus dans le cytoplasme, sans recours à un mécanisme de fusion. L'enveloppe serait ensuite altérée par les conditions réductrices dans le cytoplasme permettant la libération des capsides. Le TLM ne serait exposé qu'après une protéolyse partielle du domaine prés1 qui intervient dans les endosomes et permet l'évasion de la particule virale, toujours enveloppée, dans le cytoplasme. Cependant, cette hypothèse est également sujette à controverse car comme discuté plus tôt, le domaine préS2 qui contient le TLM ne semble pas nécessaire aux étapes précoces de l'infection (Stoeckl et al., 2006).

B. Transport de la particule vers le noyau et libération de l'ADN RC.

Les inhibiteurs de la polymérase virale ne bloquant pas la formation de l'ADNccc, la conversion de l'ADN RC en ADNccc se fait donc de façon dépendante des polymérases cellulaires et nécessite l'import de l'ADN RC dans le noyau. Les hépatocytes étant un type cellulaire qui ne se divise peu voire pas, l'ADN RC va devoir être importé à travers le NPC.

Afin d'étudier l'import des capsides au noyau, sans être affecté par les étapes précédentes du cycle, l'équipe de M. Kann a utilisé la lipofection de capsides, sous diverses formes. Ils ont montré que le transport des capsides vers le NPC est un phénomène très rapide (environ 15 minutes) indiquant qu'il s'agit d'un transport actif. La même étude a montré que cet import était inhibé par le nocodazole, qui induit la dépolymérisation des microtubules, montrant l'implication de ces derniers dans l'étape de transport des capsides vers le noyau (Rabe et al., 2006). Les travaux récents de la même équipe ont montré que ce transport était réalisé par l'interaction des capsides avec la protéine *dynein light chain LC8-type 1* (DynLL1) qui fait partie du complexe Dynéine 1, acteur majeur du transport cellulaire rétrograde. L'étude montre que les capsides vides, ou matures interagissent avec une plus forte affinité avec DynLL1 que les capsides immatures et que la phosphorylation du CTD était impliquée dans cette liaison (Osseman et al., 2018).

L'import à travers le NPC est dépendant de l'importine β mais également de l'importine a. L'interaction avec ces deux protéines semble dépendre du niveau de phosphorylation du CTD d'HBc qui contient deux NLS (Li et al., 2010). Après encapsidation puis synthèse de l'ADN RC, le CTD est phosphorylé et cela entraine alors une exposition d'une partie du CTD à l'extérieur de la capside permettant l'interaction avec les importines et l'import vers le NPC. Il n'est pas encore certain si la dissociation de la capside, se fait avant, après ou pendant le passage du NPC, et donc si l'import du génome viral dans le noyau est dépendant de la protéine HBc ou bien médiée par le complexe HBV pol/ADN RC. Cependant plusieurs études en microscopie électronique ont montré la présence de capsides dans le panier du NPC. Il a aussi été montré que les capsides fixées aux UV ne parvenaient pas à passer outre le panier ce qui semble indiquer que la dissociation de la capside est nécessaire pour passer le NPC (Gallucci and Kann, 2017; Rabe et al., 2003). L'interaction avec NUP153 serait responsable de la dissociation des capsides et permettrait le passage du génome à travers le panier à la face nucléaire du pore (Schmitz et al., 2010). L'hypothèse la plus favorable est celle d'un import des capsides matures jusqu'au panier du NPC, puis la dissociation à ce moment permettant le passage du complexe HBV pol/ADN RC. La protéine HBc va également être importée dans le noyau et se réassembler (Rabe et al., 2009).

C. Formation de l'ADNccc

Après avoir franchi la barrière nucléaire et s'être débarrassé de la capside, le génome viral, qui se trouve toujours sous forme partiellement double brin, doit être réparé en ADNccc afin de permettre l'expression des gènes viraux. Plusieurs étapes sont nécessaires. La protéine HBV pol sur le brin(-) de l'ADN RC et l'amorce ARN du brin(+) doivent tout d'abord être retirées, la région répétée *r* doit être dégradée puis l'ADNccc doit être complété et les extrémités liées, enfin il faut que les protéines histones soient recrutées afin de permettre la formation du minichromosome. Les voies de réparation des dommages à l'ADN semblent être impliquées dans les mécanismes de réparation (Schreiner and Nassal, 2017).

Les études ont montré que la polymérase virale n'est pas nécessaire à la conversion de l'ADN RC en ADNccc, la première étape est donc de retirer la protéine covalemment liée à l'extrémité 5' du brin (-). L'équipe du Pr Nassal a démontré que l'enzyme TDP2 (Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2) était capable de couper le pont disulfure entre l'ADN RC et la polymérase virale (Königer et al., 2014). Cependant l'extinction de cette protéine n'aboutit qu'a un retard de formation de l'ADNccc, ce qui indique que d'autres enzymes agissent à cette étape. L'ADN RC possède également une redondance *r*, d'environ 10 nucléotides sur des extrémités du brin (-) de l'ADN RC qu'il faut retirer afin de permettre la ligation du brin. Il semblerait que la protéine Flap endonucléase 1 soit capable de réaliser cette étape, bien que, comme pour TDP2, les expériences d'extinction n'induisent pas une inhibition complète de la formation de l'ADNccc. D'autres candidats sont donc en cours d'étude afin de comprendre cette étape (Kitamura et al., 2018). L'extrémité du brin (+) est covalemment lié à un fragment d'ARN provenant de l'ARNpg ayant servi d'amorce, mais les mécanismes impliqués dans la dégradation de cette amorce ne sont pas encore connus.

Afin de découvrir les polymérases cellulaires impliquées dans la réparation de la brèche du brin (+), l'équipe du Pr. Li a réalisé un crible d'inhibition génétique et chimique. Ils ont identifié plusieurs ADN polymérases (ADN pol) impliquées, dont l'ADNpolk, qui est une enzyme très active dans les cellules non-réplicative. Il semble que deux autres ADN polymérases (ADNpolL et ADNpolH) soient également impliquées mais avec une importance moindre (Qi et al., 2016).

Enfin les extrémités de l'ADNccc sont liées par des ADN ligases cellulaires afin de créer un ADN covalement clos. Les études récentes ont montré par un crible

d'extinction que les DNA ligase 1 et 3 étaient impliquées dans ces étapes (Long et al., 2017). Les travaux ont montré que les noyaux des cellules infectées possèdent entre 1 et 45 copies d'ADNccc selon le type cellulaire étudié (Li et al., 2018)

Dans les hépatocytes infectés, l'ADNccc est retrouvé sous la forme d'un minichromosome et donc organisé en nucléosome. Cette nucléation permet de réguler la transcription de l'ADNccc de la même façon que les gènes cellulaires. Les mécanismes permettant de recruter les protéines histones ne sont pas encore connus. Dans le noyau, l'ADNccc ne semble pas être localisé au hasard et être enrichi dans les régions actives, notamment proche des sites d'initiation de la transcription et dans les régions riches en dinucléotides CpG comme l'a montrée récemment notre équipe par la technique de *Chromosome conformation capture* (Hi-C) (Moreau et al., 2018). En plus des protéines histones, il a été montré très tôt que la protéine HBc était également présente sur l'ADNccc, et permet notamment de réduire l'espacement entre les nucléosomes (Bock et al., 1999). Son rôle dans ce contexte sera discuté dans le chapitre 4 de cette introduction.

D. Transcription virale et export des ARN.

La transcription des ARN viraux est unidirectionnelle et se fait par l'ARN polymérase II (ARN pol II). Tous les ARN vont être coiffés en 5' et polyadénylés. Le signal de polyadénylation est commun pour tous les transcrits viraux. Le VHB possède 4 promoteurs viraux. Le promoteur preC/C qui permet l'expression des ARN précore et prégénomique de 3 ,5kb. Le promoteur preS1 qui permet l'expression de l'ARN preS1 de 2,4kb codant pour la protéine de surface L-HBs. Le promoteur preS2/S qui permet l'expression de l'ARN de 2,1kb permettant l'expression des protéines M-HBs et S-HBs. Et enfin le promoteur X qui permet l'expression de l'ARN de 0,8kb codant pour HBx. Le génome contient également deux enhancers : Enhl et Enhll qui régulent respectivement les ARN preC/C et HBx et les ARN codant les protéines de surface et l'ARN HBx. Les ARN viraux sont majoritairement non épissés, bien que l'on retrouve une forme épissée de l'ARNpg SP1 ainsi que d'autres formes minoritaires d'épissage alternatif. La région PRE va permettre la régulation de l'épissage et de l'export vers le cytoplasme des ARN viraux.

L'expression correcte des ARN viraux, dont d'ARNpg, est essentielle pour la réplication virale car ce dernier va permettre la production de l'ADN RC et donc la propagation de l'infection. Les mécanismes de régulation transcriptionnelle et post-

transcriptionnelle de ces ARN -épissage, export et stabilité- feront l'objet du 3^e chapitre de cette introduction.

E. Encapsidation de l'ARNpg et rétrotranscription

Une fois exporté dans le cytoplasme, l'ARNpg va permettre la production de la protéine de capside ainsi que d'HBV pol. De façon intéressante, la traduction de la protéine HBc est environ 200 à 300 fois plus efficace que celle de la polymérase virale. Les mécanismes régulant ces proportions ne sont pas connus mais permettent d'établir un ratio idéal pour la synthèse des nouvelles particules (Bartenschlager and Schaller, 1992). Par la suite l'ARNpg va être encapsidé puis rétrotranscrit. La rétrotranscription dépend de l'encapsidation et ces deux mécanismes vont se dérouler en plusieurs étapes.

1. Liaison de l'ARNpg et de la polymérase et encapsidation.

La polymérase virale va se fixer sur la boucle ε en 5' de l'ARNpg ce qui va induire des changements de conformation à la fois sur l'ARNpg et sur HBVpol et induire l'encapsidation du complexe. Cette séquence ɛ joue un rôle primordial, elle est composée de deux tiges séparées par une boucle latérale, et d'une une boucle apicale (Figure 16A). Il s'agit d'une structure conservée au sein des hepadnavirus. La séquence ε est également présente à l'extrémité 3' de l'ARNpg, et de tous les ARN viraux, mais cette séquence terminale ne sera pas utilisée pour l'encapsidation (Knaus and Nassal, 1993). La fixation de la polymérase sur la séquence ε de l'ARNpg est nécessaire pour l'encapsidation du complexe. Il a été montré que HBV pol n'était pas encapsidé en absence de l'ARNpg. De même un ARN avec la séquence epsilon ne sera encapsidé qu'en présence de la polymérase. Des facteurs cellulaires sont également nécessaires à l'encapsidation du complexe ribonucléoprotéique, notamment des protéines chaperonnes comme Hsp90 et Hsp70 (HSP : Heat shock protein) (Seo et al., 2018) (Figure 16B). De façon intéressante ces deux protéines vont également être encapsidées et servir de chaperonne pour la polymérase virale lors de la rétrotranscription.

Amorçage protéique au niveau de la séquence ε

Le mécanisme de rétrotranscription de l'ARNpg en ADN RC est un mécanisme singulier à la famille des *Hepadnaviridae*. En effet la rétrotranscription débute par un mécanisme d'amorçage protéique dans lequel la tyrosine 63 du domaine TP d'HBV pol va être covalemment liée à une deoxyguanosine monophosphate (dGMP) (Wang and Seeger, 1992). Il s'agit d'un amorçage qui est séquence spécifique, et qui permet la copie de 3-4 nucléotides au niveau de la boucle latérale de la structure ε par le



Figure 16 : Séquence ε et amorçage protéique.

domaine RT d'HBV pol. Il a été montré que la présence du dimère Hsp70/90 est nécessaire pour cette étape et va permettre à la polymérase d'adopter la bonne conformation pour se fixer à l'ARNpg et également pour entamer le processus d'amorçage protéique. Il a également été montré que la présence de la coiffe en 5' de l'ARNpg était nécessaire pour cette étape de la réplication et que si celle-ci était présente mais éloignée de la séquence ε , l'amorçage était impacté (Jones et al., 2012). Les inhibiteurs de la RT n'ont pas d'impact sur l'étape d'encapsidation ce qui montre que la synthèse de cette amorce est une étape postérieure à l'encapsidation.

Les étapes suivantes vont être réalisées au sein des capsides virales dans le cytoplasme et des mutations ou délétions du CTD d'HBc vont inhiber leur déroulement, quand bien même l'ARNpg est correctement encapsidé et fixé à HBV Pol.

A) Séquence de la tige boucle. La boucle latérale permettant l'amorçage protéique est annotée en gras. L'amorce (rouge) est liée par un groupement ? a la tyrosine Y63 de la polymérase virale (Tiré de Nassal, 2008). B) La polymérase se fixe à la séquence ε grâce aux chaperonnes Hsp70/90 ce qui va induire l'amorçage protéique. La nécessité d'avoir la coiffe en 5' de l'ARNPg proche de la séquence ε laisse penser que les facteurs s'y fixant sont nécessaires à l'amorçage protéique. (Tiré de Hu and Seeger, 2015)

3. Synthèse du brin (-)

Une fois l'amorçage réalisé, la polymérase covalemment liée à l'amorce nucléotidique va être transférée à l'extrémité 3' de l'ARNpg où elle va être complémentaire à l'extrémité 3' proximale de la répétition directe 1 (DR1) (Figure 17A). Cependant la reconnaissance de DR1 ne peut pas se faire seulement par la séquence de l'oligonucléotide. En effet la répétition ne couvre que 3 à 4 nucléotides et une



Figure 17 : Rétrotranscription de l'ARNpg en ADN RC (adapté de Hu and Seeger 2015).

A) Transfert de l'amorce ADN depuis la séquence ε vers la séquence DR1 se trouvant en 3' de l'ARNpg. B) synthèse du brin (-) et digestion de l'ARNpg par le domaine RNase H. C) Transfert de l'amorce ARN depuis la séquence DR1 vers la séquence DR2 du brin (-). D) synthèse du brin (+) vers l'extrémité 5' du brin (-). E) Changement de matrice pour la synthèse du brin (+), vers l'extrémité 3' du brin (-). F) synthèse partielle du brin (+).

séquence complémentaire à cet oligomère peut donc se retrouver à d'autres endroits du génome viral. Cette étape nécessite donc l'intervention de facteurs permettant une circularisation de l'ARNpg et donc un rapprochement entre la structure ε et DR1. L'élément φ en amont de DR1 est par exemple capable de s'apparier avec la tige haute de la structure ε (Tang and McLachlan, 2002). Un autre appariement entre la séquence ω , localisé en aval de DR1, et la séquence φ va également jouer un rôle dans la synthèse du brin (-) (Abraham and Loeb, 2007). Des travaux ont également montré que les protéines présentes sur la coiffe 5' et sur la queue polyA pouvaient interagir et permettre la circularisation de l'ARNpg. La fixation de l'amorce à DR1 va ensuite initier la synthèse du brin (-) de l'ADN RC par le domaine RT d'HBV pol jusqu'à l'extrémité 3' de l'ARNpg. En parallèle de la synthèse d'ADN, le domaine RNaseH d'HBV pol va

dégrader l'ARNpg. Du fait de la redondance des extrémités de l'ARNpg et de la position de DR1, le brin (-) comporte une répétition de 9 nucléotides à son extrémité (r) ce qui joue un rôle dans la recircularisation du génome et facilite la synthèse du brin (+) (Seeger et al., 1986) (Figure 17B).

4. Synthèse du brin (+)

La synthèse du brin (+) se fait en deux étapes avec deux sauts de matrice. L'extrémité 5' coiffée de l'ARNpg ne sera pas dégradée et va servir d'amorce à la synthèse du brin (+). Elle est complémentaire de la région répétée directe 2 (DR2) à l'extrémité 5' du brin (-) et va donc s'y fixer (Figure 17C). Cela va permettre la synthèse du brin (+) vers l'extrémité 5' répétée du brin (-) (Figure 17D). Lorsque la polymérase arrive à l'extrémité 5' du brin (-), un nouveau saut de matrice va s'opérer. Grâce à la séquence *r* également présente sur l'extrémité 3' du brin (-), le brin (+) naissant va pouvoir s'apparier à cette région et la synthèse pourra se poursuivre (Figure 17D et E).

La synthèse du brin (+) va être partielle, produisant des extrémités 3' hétérogènes. Cet arrêt de la synthèse peut être causé par des contraintes imposées par la polymérase ou la capside. Il a également été montré que la synthèse de ce brin peut être étendue lorsque les capsides sont incubées en présence de nucléotides, ce qui indiquerait que le manque de dNTP dans la capside soit à l'origine de ce brin incomplet.

A ce moment les capsides dites matures vont pouvoir soit être dirigées vers le RE afin d'être enveloppées, soit être envoyées vers le noyau afin de renouveler/augmenter le pool d'ADNccc.

F. Sortie des particules virales

Il semblerait que la protéine core change de conformation lors de la maturation de l'ADN RC. La phophorylation du CTD joue un rôle primordial et fait que seules les capsides matures vont être enveloppées. La capside peut alors interagir avec la partie N-ter de la protéine L-HBs au niveau du RE et va induire la translocation de la particule dans le RE. Le bourgeonnement de la particule dans le RE est dépendant de la voie ESCRT. C'est la protéine HBc qui contient un domaine PPAY qui permet le recrutement de la machinerie, par liaison directe, ou bien par l'intervention d'autres protéines cellulaires (Lambert et al., 2007). Paradoxalement, les capsides vides vont

également être enveloppées et sécrétées, en quantité 100 fois supérieure à la particule de Dane. On estime que seules10 particules virales infectieuses sont sécrétées par jour par hépatocyte infecté.

3.<u>Régulation de la biologie des ARN viraux :</u> <u>une étape cruciale pour le maintien de la</u> <u>réplication.</u>

Le VHB persiste dans le noyau des cellules infectées par la présence de son ADNccc, même chez les patients qui suivent un traitement. Cet épisome viral ne possède pas d'origine de réplication, son maintien lors de la division cellulaire dépend donc majoritairement de la production de particules virales contenant de l'ADN RC mature qui vont être recyclées vers le noyau. Ces particules étant formées à partir de l'ARNpg, il est donc nécessaire aujourd'hui de mieux comprendre le métabolisme des ARN viraux. Ce chapitre s'efforcera donc de décrire la biologie de ces ARN : leur transcription, la régulation de l'épissage, leur export vers le cytoplasme ainsi que leur stabilité.

A. Régulation transcriptionnelle.

1. Les promoteurs viraux et les facteurs de transcription associés.

Comme décrit précédemment, le génome viral contient 4 promoteurs et 2 enhancers qui régulent la transcription des ARN viraux. La transcription de ces promoteurs va être très largement régulée par des facteurs de transcriptions foies spécifiques notamment de la famille des facteurs nucléaires hépatocytaires (HNF : Hepatocytes nuclear factor) II s'agit là d'un second mécanisme de spécificité hépatotropique.

* <u>Promoteur précore/core</u>

Le promoteur preC/C permet la production des ARN précore et des ARNpg de 3,5kb à partir de deux sites d'initiation très proches. Il est composé de deux régions : le promoteur basal du core (BCP) et une région régulatrice en amont du BCP (CRUS : *core upstream regulatory sequence*) (Figure 18). Le BCP contient les régions promotrices de l'ARN précore et de l'ARNpg qui se superposent mais peuvent

Introduction

fonctionner séparément. Cette région ne contient pas de domaine TATAbox standard mais bien deux régions « *TATAbox like* » pour chacun des promoteurs précore et prégénomique environ 20 à 30 nt en amont de leur site d'initiation de la transcription (Yu and Mertz, 1996). Le BCP permet à lui seul d'activer la transcription des ARN précore et ARNpg mais son efficacité reste assez faible et il nécessite la présence des deux enhancers, et particulièrement de l'Enhl pour être actif.

La région en amont permet d'activer le BCP entre 200 et 2000 fois et fonctionne de manière orientée (Moolla et al., 2002). Il peut être sous divisé en 2 domaines, CRUS-A et CRUS-B qui régulent le BCP séparément et différemment suivant la lignée cellulaire. Cette région est sous-divisée en domaines, les boites α , β , γ et δ . (Figure 18).



Figure 18 : Régulation de l'expression du promoteur preC/C.

Le promoteur précore contient deux sites d'initiation de la transcription permettant l'expression de l'ARNpg et de l'ARN précore. Il est composé de deux domaines qui vont permettre son activation. Le BCP (Basal core promoter) qui contient les deux sites d'initiation et deux séquences proches d'une TATA box permettant leurs expressions respectives. En amont du BCP se trouve la région CRUS, qui peut être sous divisé en deux domaines, et en 4 sous domaines. En amont de cette région régulatrice nous retrouvons un site de régulation négative NRE sous divisé en 3 boites α , β et γ .

En amont du promoteur, on retrouve une région de régulation négative (NRE : Negative regulatory element) qui peut diminuer voire supprimer l'activité du promoteur ainsi que de EnhII. Il peut être divisé en 3 sous-domaines le NREα, NREβ et NREγ qui fonctionnent de concert (Chen and Ou, 1995).

La régulation de ce promoteur est primordiale car elle permet l'expression de l'ARNpg et donc la réplication virale. De nombreux facteurs vont donc intervenir. Le facteur de transcription foie spécifique HNF-4 possède deux sites de fixation sur le promoteur preC/C. Le premier site de fixation est spécifique pour le facteur HNF4 et permet d'activer la transcription. Le deuxième site est le lieu d'une fixation de plusieurs autres facteurs de transcription qui vont entrer en compétition et réguler différemment l'expression du promoteur. La fixation de l'hétérodimère RXR α -PPAR α (retinoid X receptor α /Peroxysome proliferator activated receptor α) va induire la transcription de l'ARNpg, sans effet sur l'ARNpreC. La fixation du facteur COUP-TF (Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor) va, elle, provoquer l'inhibition de l'expression des 2 ARN de 3,5kb (Quarleri, 2014; Raney et al., 1997). Sur ce deuxième site, HFN-4 semble moduler positivement l'expression de l'ARN précore quand il interagit avec le facteur fetoprotein transcription factor (FTF), en revanche, l'interaction avec le facteur testicular orphan receptor 4 induit une répression (Gilbert et al., 2000; Lin et al., 2003).

Le facteur C/EBP (*CCAAT/enhancer binding protein*) est également un facteur de transcription dont l'expression est enrichie dans le foie et possède un site de fixation au niveau du promoteur du core. Il permet d'activer la transcription lorsqu'il est exprimé à un faible niveau. En revanche, lorsqu'il est surexprimé, il induit une inhibition du promoteur (López-Cabrera et al., 1990, 1991). Le facteur Jumonji domain containing 5 (JMJD5) a également été montré comme essentiel à l'expression des gènes viraux. Ce facteur interagit avec HBx et permet de réguler l'expression d'un certain nombre de facteurs de transcription présenté ici, notamment HNF3, HNF4 et C/EBP à travers son activité hydrolase (Kouwaki et al., 2016).

Le facteur de transcription ubiquitaire *Specificity protein 1* (SP1) possède plusieurs sites de fixation au niveau du promoteur preC/C : deux dans le BCP et un troisième au niveau de l'enhancer II. Les deux premiers sites permettent d'activer spécifiquement ce promoteur et leur mutation entraine une forte diminution de l'expression du promoteur (Li and Ou, 2001).

L'infection par le VHB va induire une augmentation de l'expression de la protéine Sirtuin1 (Sirt-1), ce qui aura pour effet d'augmenter la fixation de la protéine activatrice 1 (AP-1) de la famille C-jun sur le promoteur preC/C et d'augmenter l'expression des ARN de 3,5kb (Deng et al., 2017; Ren et al., 2014).

La protéine PUF60 (Poly(U) Binding Splicing Factor 60) semble également être impliquée dans la régulation de la transcription de ce promoteur. La surexpression augmente la transcription de l'ARNpg à des temps courts après infection, et ceci est médié par le recrutement du facteur de transcription TCF7L2 (Transcription Factor 7 Like 2) dans la région BCP/EnhII. Cependant l'action de PUF60 est à deux niveaux car son expression va induire la dégradation de l'ARNpg à des temps plus longs après infection (Sun et al., 2017).

Enfin, il a été montré récemment que la protéine TARDBP (trans-activation responsive DNA binding protein) est un facteur proviral et se fixe sur le promoteur sur deux sites situés dans la région 1804-1849 du génome. De plus ce facteur interagit avec de nombreux facteurs précédemment décrits pour réguler l'expression du virus comme Hsp90 ou PUF60 et pourrait réguler leurs activités. Son extinction résulte en une diminution importante de la réplication virale (Makokha et al., 2019).

<u>* Promoteur preS1</u>

Le promoteur preS1 permet la production des ARN de 2,4kb codants pour la protéine L-HBs. Il s'agit du seul promoteur du génome à posséder une séquence



Figure 19 : Régulation de l'expression du promoteur preS1.

Le promoteur preS1 permet l'expression de l'ARN codant pour L-HBs et est composé d'une TATA box qui va permettre la fixation de la protéine TBP.

canonique de TATAbox permettant la fixation la TATAbox binding protein (TBP). Le site de fixation du facteur de transcription HNF1 en amont du site TATA est le deuxième élément nécessaire et suffisant pour l'expression de ce promoteur (Moolla et al., 2002). D'autres facteurs comme le facteur de transcription SP1, l'hétérodimère PPARα-RXRα et HNF-3 peuvent tout de même réguler positivement l'expression de ce promoteur (Li and Ou, 2001; Raney et al., 1992). La protéine Prospero-related homeobox (Prox1) interagit avec HFN1 et SP1 et diminue leur interaction avec le promoteur, ce qui impacte la transcription (Qin et al., 2009). Les deux facteurs agissant d'ailleurs sur d'autres promoteurs/enhancers viraux, Prox1 va inhiber de façon générale la transcription des gènes viraux. Le promoteur preS2/S a été décrit comme régulant négativement le promoteur preS1.

<u>* Promoteur preS2/S</u>

Le promoteur preS2/S permet la production des ARN de 2,1kb codants pour les protéines M-HBs et S-HBs. Le promoteur preS2/S peut être divisé en 7 éléments (A-G) qui fixent les facteurs de transcription. Ce promoteur est complètement dépourvu de séquence TATA ou s'en rapprochant. Il partage en revanche des homologies avec le promoteur des gènes tardifs du SV40 (région D). La région A, B et C régulent positivement l'expression du promoteur. La région F en revanche semble réguler négativement le promoteur, mais cet effet est contrecarré par la région E qui la chevauche (Moolla et al., 2002). Le motif CCAAT est essentiel et permet de stimuler l'expression mais également de réprimer le promoteur S1 ceci grâce au facteur de transcription TF γ (Transcription Factor γ) et C/EBP qui s'y fixent (Bock et al., 1999).

L'activité du promoteur pres2/S est également très largement promue par la fixation du facteur de transcription NF1 environ 190 pb avant le site d'initiation de la transcription (Shaul et al., 1986). Bien que dépourvue de séquence TATA, la protéine TBP se fixe sur le promoteur et régule positivement son expression (Bogomolski-Yahalom et al., 1997). 3 sites de fixation pour le facteur SP1 sont également décrits dans cette région et permettent l'activation de la transcription de l'ARN de 2,1kb (Raney et al., 1992).

Le promoteur contient également une séquence CRE (*CREB responsive element*) permettant de recruter le facteur de transcription CREB (*cyclic AMP-response element binding protein*) qui induit une régulation positive de la transcription de l'ARN preS2/S (Tacke et al., 2005).



Le promoteur preS2/S permet l'expression d'un ARN de 2,1kb codant pour M-HBs et S-HBs. Il est composé de 7 domaines différents A-G. Le motif CCAAT est essentiel à son activation et permet également de diminuer l'expression du promoteur preS1.

* Promoteur X

Le promoteur X permet la production de l'ARN de 0,8kb codant pour HBx. La région régulatrice se situe environ 140nucleotides en amont du site d'initiation de la transcription et est une séquence de 21 nucléotides riches en GC (Tokusumi et al., 2004). Il ne possède pas de séquence consensus correspondant à une TATAbox et sa transcription semble être régulée par le facteur NRF1 (Nuclear respiratory factor 1) qui est essentiel pour l'expression du gène. (Tokusumi et al., 2004). La transcription d'HBx est également régulée par les facteurs C/EBP, ATF (Activating transcription factor 1) et AP-1/jun-Fos (Moolla et al., 2002; Quasdorff and Protzer, 2010).

Récemment, une étude a permis d'annoter tous les sites d'initiation de la transcription sur le génome viral, confirmant les sites principaux déjà décrit, mais identifiant un deuxième site d'initiation de la transcription très fréquemment utilisé dans

le gène d'HBx aboutissant à une forme tronquée de la protéine HBx (Altinel et al., 2016).



Figure 21 : Régulation de l'expression du promoteur d'HBx.

Le promoteur HBx permet de l'expression d'un ARN de 0,8kb exprimant HBx. Il contient une région riche en GC qui va être indispensable à son expression. Deux sites d'initiation de la transcription ont été décrit dans cette région.

× Enhancer I

Le génome possède deux enhancers. L'enhancer I est une séquence d'environ 120pb dans la région S, le promoteur d'HBx et le début de l'ORF HBx. Il permet d'augmenter la transcription des promoteurs X et preC/C et fonctionne de manière orientée. Il est composé d'une région 5' modulatrice et d'un domaine 3' qui sont accessoires. En revanche le domaine central est essentiel et permet la fixation de nombreux facteurs de transcription (Moolla et al., 2002).

Le facteur de transcription *Signal transducer and activator of transcription* 3 (STAT3) est capable de se fixer sur ce domaine central et interagit avec le facteur nucléaire HNF-3 pour augmenter l'efficacité de l'enhancer. L'interaction entre l'enhancer et STAT3 est augmentée lors de l'expression d'interleukine 6 et d'EGF (*Epidermal Growth factor*) (Waris and Siddiqui, 2002). De façon intéressante le facteur STAT3 est augmenté lors d'une infection en présence d'HBx. Il a d'ailleurs été montré que les inhibiteurs de STAT3 diminuaient la réplication virale et réduisaient également le développement des tumeurs associées au virus, faisant de cette protéine une cible pour le traitement des tumeurs liées au VHB (Yang et al., 2016).



Figure 22 : Régulation de l'activité de l'enhancer I.

L'enhancer I peut être divisé en 3 domaines. Le domaine central qui est le domaine jouant un rôle majeur et une région modulatrice en 5' et une région 3' chevauchante avec le promoteur d'HBx.

L'activation de la transcription du promoteur preC/C par l'Enhl passe également par la fixation des facteurs SP1, HNF-4, EF-C et RXRα sur cet élément, ce qui augmente son activité. Le facteur COUP-TF semble être un répresseur de cet enhancer, certainement en rentrant en compétition avec la fixation des facteurs HNF-3 et STAT3 sur l'Enhl (Garcia et al., 1993; Ori et al., 1994).

Cet enhancer possède une séquence CRE qui permet le recrutement de CREB via son interaction avec HBx (Kim et al., 2008; Maguire et al., 1991). L'activation de la transcription par CREB est nécessaire et amplifiée par son coactivateur, le complexe CBP/P300 grâce à son association avec HBx (Cougot et al., 2007).

※ Enhancer II

L'enhancer II se trouve dans la région du promoteur preC/C plus spécifiquement dans la région CRUS. II va réguler l'expression des promoteurs X, S1 et S2/S. Comme pour le premier enhancer cette régulation se fait de manière orientée. Il est composé de deux domaines IIA et IIB qui fonctionnent de façon complémentaire, et n'ont pas d'activité séparément. Il peut être régulé négativement par la région NRE en amont du promoteur preC/C (Moolla et al., 2002). Le facteur hépatocytaire HNF-3 se fixe sur l'enhancer au niveau de motifs spécifiques. Des mutations sur ces sites de fixations ou bien l'extinction de l'expression du facteur induisent une diminution considérable de l'activité de l'enhancer (Li et al., 1995). Comme décrit précédemment la protéine SP1 possède trois sites de fixation dont deux qui permettent de réguler spécifiquement l'expression du promoteur preC/C. Celui présent dans l'EnhII permet lui de réguler positivement son action et augmenter la transcription de tous les gènes (Li and Ou, 2001). Enfin le facteur C/EBP qui est primordial pour la réplication virale est également responsable de l'activation de cet enhancer, et est activé par interaction avec la protéine virale HBx (Choi et al., 1999; López-Cabrera et al., 1991). Le recrutement du facteur C/EBP sur l'enhancer est augmenté par le facteur *Jumonji domain containing 3* (JMJD3) (Chen et al., 2016a).



Figure 23 : Régulation de l'activité de l'enhancer II.



Des travaux semblent montrer que l'expression des gènes viraux est ordonnée et que les gènes activés par l'enhancer I sont exprimés dans un premier temps, et nécessaires à l'activation par l'EnhII (Doitsh and Shaul, 2004).

2. Régulation épigénétique de la transcription

Comme l'ADN cellulaire, le minichromosome du VHB est recouvert de protéines histones. Cependant il a été montré que l'espacement entre les nucléosomes était de 180 nucléotides pour le VHB contre 200 nucléotides pour les gènes viraux. Cette diminution de l'espacement semble être causée par la présence de la protéine HBc (Bock et al., 2001). Comme les gènes cellulaires, le VHB peut donc être soumis à des régulations épigénétiques. Celles-ci peuvent intervenir au niveau de méthylations de l'ADN, de modifications post-transcriptionnelles (MPT) des histones, mais également par l'intervention d'ARN non codants.

Méthylation de l'ADNccc

La méthylation de l'ADN peut intervenir sur les cytosines, au niveau du carbone 5 du cycle pyrimidique. Cette modification peut être retrouvée dans des régions très riches en dinucléotides CG appelés ilots CpG (CpGi) ainsi que dans les gènes, et est réalisée par des enzymes de la famille des DNA méthyltransferases. Environ 70% des promoteurs des gènes humains sont associés à des ilots CpG. Généralement les CpGi sont non méthylés, et la présence de méthylations sur ces régions est associée à un environnement réprimé du promoteur. La méthylation le long des gènes permet de réguler les mécanismes d'épissage (Weber et al., 2007). La méthylation peut



Figure 24 : Îlots CpG sur l'ADN viral (Adapté de Jain et al., 2015).

Les ilots CpG sont des régions où le dinucléotide CG est fortement représenté. La méthylation de ce CpGi va induire la répression de l'expression des gènes. Le génome du VHB possède plusieurs régions de ce type donc les CpGi l à III sont les plus décrits.

également être un mécanisme de défense contre les pathogènes.

Sur l'ADNccc, entre 3 et 5 CpGi ont été décrits suivant les génotypes (Zhang et al., 2013b), les CpG I, CpG II et CpG III sont les plus décrits, leurs positions sont présentées dans la Figure 24. L'ADN RC dans les capsides du cytoplasme ainsi que dans les virions sécrétés n'est pas méthylé. Il a été reporté que dans certaines biopsies de CHC l'ADN viral intégré ou non peut être méthylé sur les CpGi I et III, ce qui inhiberait l'expression des antigènes de surface et pourrait être à l'origine des infections occultes (Jain et al., 2015). Le taux de méthylation de l'ADNccc, notamment des CpGi I et III est plus élevé dans les tissus issus de CHC que dans les prélèvements issus de tissus cirrhotiques et dans les hépatocytes infectés provenant des tissus non

pathologiques (Kaur et al., 2010). Cependant aucun lien certain n'a encore pu être établi entre l'expression des gènes viraux et le niveau de méthylation.

De façon intéressante, les travaux réalisés au sein de notre équipe ont montré que l'ADNccc dans le noyau des hépatocytes infectés contacte préférentiellement les CpGi dans les régions actives du génome. Ces CpGs non méthylés sont fortement enrichis par la protéine *cellular factor CXXC finger protein* 1 (Cfp1) ce qui induit le recrutement de la protéine Set1A qui va induire la triméthylation de la lysine 4 de l'Histone H3 (H3K4me3) (Brown et al., 2017; Thomson et al., 2010). Les travaux de notre équipe ont montré que le facteur Cfp1 est recruté sur l'ADNccc et permet de réguler la transcription virale. En effet, l'extinction de l'expression du facteur induit une forte diminution de la présence de la marque activatrice H3K4me3 liée à une diminution de la transcription virale. Ces résultats indiquent que la régulation la méthylation de l'ADN semble être importante pour réguler l'expression des gènes viraux (Moreau et al., 2018)

Modifications post traductionnelles des histones

Les MPT des histones permettent une régulation fine et dynamique de l'expression des gènes. Elles peuvent être de plusieurs types. L'acétylation des histones va diminuer l'interaction entre l'ADN et le nucléosome et donc rendre cet ADN plus accessible pour la transcription. Cette acétylation est déposée par des histones acétyles transférases (HAT) comme CBP ou P300, impliquées dans la réplication virale, et peuvent être retirées par des histones déacétylases (HDAC). Une deuxième MPT bien connue est la méthylation des lysines ou des arginines des chaines latérales des histones. Celles-ci peuvent être activatrices ou inhibitrices selon leur position. La marque H3K4me3 est par exemple signe d'un environnement actif pour l'expression du gène, alors que la triméthylation sur la lysine 27 de la même histone (H3K27me3) est associée aux gènes présents dans l'hétérochromatine et donc réprimée. Ces modifications des lysines sont réalisées par des lysines méthyles transférases (KMT) et des lysines déméthylases (KDT).

Par des approches de Chromatine-Immunoprécipitation (Ch-IP) couplée à du séquençage, les différentes marques présentes sur l'ADNccc ont pu être cartographiées dans des modèles d'infection *in cellulo* (PHH et HepG2) mais également chez un patient infecté ne présentant pas de tumeur. Les résultats de cette étude montrent que l'ADNccc est associé à un niveau élevé de marques de chromatine

active comme H3K4me3 et H3K27Ac et déplété en marques inactives. Les mêmes caractéristiques ont été retrouvées à la fois en lignée HepG2, en Hépatocytes primaires humains et dans le prélèvement du patient non cirrhotique. De plus le profil des différentes marques épigénétiques est remarquablement semblable entre les différents modèles étudiés (Tropberger et al., 2015). La même équipe a étudié plus récemment la présence de ces marques dans 18 biopsies de patients infectés chroniquement à différents stades de l'infection. Cette étude a confirmé que l'ADNccc était majoritairement associé à des marques actives de la chromatine mais avec cependant une répartition différente de celle observée dans l'étude précédente. Ces marques ont pu être corrélées positivement avec l'expression des gènes. Concernant les marques épigénétiques répressives, ils ont confirmé l'absence de la modification H3K27me3 mais ont observé la marque H3K9me3 chez la moitié des patients. Cependant celle-ci est présente à un niveau plus faible que la marque H3K4me3 activatrice (Flecken et al., 2019).

La régulation épigénétique de l'ADNccc est fortement réalisée par l'acétylation des histones. Cette marque activatrice est majoritairement apposée sur les histones H3 et H4. Les inhibiteurs d'histones désacétylases induisent une augmentation de l'expression des gènes viraux et il a été montré que dans des biopsies de tumeurs, une hypoacétylation de l'ADNccc était corrélée avec une faible virémie (Pollicino et al., 2006).

La protéine HBx est responsable de recrutement de certaines HAT comme CBP/P300 et PCAF et en son absence, la protéine HDAC1 est rapidement recrutée sur l'ADNccc. (Belloni et al., 2009; Cougot et al., 2007). De plus il a été montré qu'en l'absence d'HBx, l'ADNccc était réprimé épigénétiquement par une diminution de l'acétylation de l'histone H3 et de la marque H3K4me3 de cette histone et l'augmentation de la marque d'hétérochromatine H3K9me3 et de la protéine d'hétérochromatine 1 (HP1). En absence d'HBx, cette marque d'hétérochromatine serait déposée par la protéine SETDB1 (*SET domain bifurcated 1*) et l'extinction de l'expression de cette protéine permet de restaurer partiellement l'expression d'un virus déficient pour HBx. Enfin il a été montré que la levée de la répression induite par SETDB1 était réalisée par l'enzyme *Lysine-specific histone demethylase 1A*, une enzyme de la famille des KDM (Alarcon et al., 2016; Rivière et al., 2015). Par tous ces mécanismes, HBx apparait comme un régulateur épigénétique pour l'expression des gènes viraux (Figure 25).

Des cribles par siARN ont permis de découvrir que la protéine PRMT5 (*Protein arginine N-methyltransferase 5*), une arginine méthyltransférase, agit comme un facteur de restriction en méthylant l'arginine 3 de l'histone H4, qui est une marque répressive et diminue la fixation de l'ARN PolII. De façon intéressante la protéine HBc semble être impliquée dans la régulation par PRMT5 et permettrait son recrutement sur l'ADNccc (Zhang et al., 2017).





L'ADNccc peut être régulé par de nombreuses modifications épigénétiques. A) En présence d'HBx la chromatine présente sur l'ADNccc possède majoritairement des marques activatrices comme une hyperacétylation des histones ainsi que la présence de la marque activatrice H3K4me3 permettant l'expression des gènes viraux. B) En absence d'HBx, les marques présentes sur l'ADNccc sont répressives avec notamment une hypoacétylation des histones ainsi qu'une diminution de la présence d'HBc.

Enfin, l'infection par le VHB diminue l'expression de DDX5 (DEAD-Box Helicase 5) dont l'un des rôles est notamment de stabiliser la protéine SUZ12 du complexe répresseur polycomb 2 (PRC2). Ce complexe induit l'apposition des marques négatives H3K27me3 et donc la répression des gènes cellulaires, notamment ceux liés au développement. PRC2 est capable de réprimer les gènes viraux et il a été montré qu'en présence du virus, notamment en présence d'HBx, la répression induite par PCR2 était en partie levée sur les gènes viraux, mais également sur les gènes

cellulaires induisant leur dérégulation. Ce mécanisme pourrait avoir un impact non négligeable sur le processus tumoral, levant notamment la répression de l'expression des gènes liés à la différenciation cellulaire (Zhang et al., 2016).

<u>Régulation par les ARN non codants.</u>

Enfin un dernier niveau de régulation épigénétique peut se faire par l'expression de microARN. Ces petits ARN de 19-22 nucléotides vont modifier l'expression de certaines protéines en ciblant spécifiquement leurs ARN messagers ayant pour effet d'inhiber leur traduction. De ce fait, les miARN peuvent être considérés comme des acteurs de la réponse immunitaire innée, et inhiber la réplication virale. De façon générale, il a été montré que les microARN inhibent la réplication du VHB, en effet, lors de l'inhibition de la voie de biogenèse des microARN, la réplication virale est augmentée (Wang et al., 2013). Mais de nombreuses études montrent que le virus a réussi à détourner certains de ces miARN afin de les utiliser pour mieux se répliquer.

Jusqu'ici, une seule étude rapporte l'expression d'un miARN à partir du génome viral. HBV-miR-3 est exprimé à partir du génome aux positions 373-393 et est retrouvé fortement exprimé dans les tumeurs. Il pourrait réguler négativement la réplication virale. Cependant les auteurs décrivent une expression élevée également en phase de tolérance immunitaire quand le virus se réplique fortement, ce qui semble contre intuitif (Yang et al., 2017b).

De plus en plus de travaux montrent que le virus a établi des stratégies pour échapper au miARN le ciblant. Le cas le plus connu est celui du miR-122. Ce microARN est en effet fortement exprimé dans le foie et induit la dégradation des ARN viraux en ciblant une région conservée de l'ARNpg dans la région codante d'HBV pol. L'expression de ce petit ARN est diminuée lors de l'infection par le VHB en culture cellulaire, et Chen et al. ont montré une corrélation inverse entre le nombre de copies de génomes viraux et la quantité de miR-122 dans le sérum de patients infectés (Chen et al., 2011). De même miR15a et miR205, qui ciblent l'ARN d'HBx, sont capables d'inhiber l'expression des ARN mais sont diminués en condition d'infection. Il semblerait que l'ARN d'HBx soit responsable de cette diminution (Wang et al., 2013; Zhang et al., 2013a).

Certains microARN dirigés contre les gènes viraux voient leur expression augmentée au cours de l'infection sans être contrecarré par le virus, induisant donc une diminution de la réplication virale. C'est le cas des microARN miR-210 et miR- 199a-3p qui ciblent respectivement la région preS1 et la région S du génome viral (Zhang et al., 2010). MiR-20a et miR-92a-1 sont dirigés contre la région codante d'HBV pol et HBx (Jung et al., 2013). Enfin la région codante pour HBc est également ciblée par le miR-1231 dont l'expression est augmentée chez des souris infectées par le virus (Kohno et al., 2014). Sans montrer l'évolution de son expression au cours de l'infection, il a été montré que miR-125a-5p qui est dirigé contre la région S du génome, et était capable de réprimer l'expression virale (Potenza et al., 2011).

Certains microARN dirigés contre des protéines cellulaires ont été identifiés comme des facteurs proviraux en agissant de façon indirecte en modifiant l'expression de certains facteurs de restriction d'HBV. C'est le cas de mir29a, miR-146a, miR-1, miR-15b, miR-152, miR-370, miR-372, miR-501 et miR-548a (Sagnelli et al., 2018; Wang and Li, 2018; Wu et al., 2017).

Enfin les petits ARN miR-20, miR-34a, miR-130, miR-141 miR-155 miR101 inhiberait la réplication virale de façon indirecte en agissant sur des protéines cellulaires (Moon et al., 2019; Sagnelli et al., 2018; Wang and Tian, 2017).

Ces microARN ont un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire et leur dérégulation par le VHB aurait un impact sur la promotion du processus tumoral.

B. Régulation post-transcriptionnelle

La transcription des ARN chez les eucaryotes est couplée à l'épissage ainsi qu'à l'export des ARN vers le cytoplasme et ces évènements sont régulés par des complexes ribonucléoprotéiques de façon coordonnée. Les ARN pré-messagers en cours de transcription vont être pris en charge par le spliceosome, qui va par la suite médier l'interaction des ARN épissés avec la machinerie d'export nucléaire. De ce fait les ARN non épissés ne sont généralement pas exportés, et vont s'accumuler dans le noyau. Pour le VHB la majorité des gènes viraux sont exprimés à partir d'ARN non épissés et le virus utilise donc des mécanismes spécifiques afin que ses ARN ne soient pas épissés et puissent être exportés avant d'être dégradés.

1. Variants d'épissage et régulation de l'épissage

Bien que les gènes viraux soient exprimés à partir d'ARN non épissés, des variants d'épissage ont pu être identifiés en laboratoire en culture cellulaire et chez des souris infectées, mais également dans des sérums de patients infectés (Sommer, 2008). A ce jour, on dénombre plus de 13 formes alternativement épissées pour

l'ARNpg et 4 formes d'épissage alternatifs pour l'ARN preS2/S (Candotti and Allain, 2017). De façon intéressante, les sites d'épissages retrouvés lors de l'épissage de l'ARN preS2/S (5'-458 et 3'-1305/85) sont également présents sur l'ARNpg mais les variants d'épissage correspondant n'ont jamais été retrouvés (Figure 26). L'ARN SP1 qui est épissé à partir de l'ARNpg entre les nucléotides 2447 et 489 va être retrouvé dans 30% des particules virales et correspond à plus de 50% des variants d'épissage retrouvé dans les sérums de patients infectés (Abraham et al., 2008; Wu et al., 1991). Il semble que la proportion de formes épissées dans le sérum des patients infectés augmente avec la gravité des symptômes (Chen et al., 2015).

Le variant d'épissage SP1 permet l'expression de la protéine HBSP mais également d'une forme tronquée de la protéine HBc dépourvue du dernier acide aminé (Cystéine) (Soussan et al., 2000; Su et al., 1989). Un autre variant d'épissage dont l'intron entre les nucléotides 2447 à 2902 est épissé permet l'expression d'une protéine chimère HBV Pol et L-HBs dénommé P-S FP (Polymerase-Surface Fusion protein) (Huang et al., 2000) (Figure 26). L'expression de la protéine HBSP joue un rôle dans la régulation de l'immunité du foie en diminuant l'inflammation et donc peut participer à l'échappement viral (Duriez et al., 2017). Les rôles des deux autres protéines formées à partir des variants d'épissage restent encore à étudier. Les formes épissées pourraient également réguler l'expression des gènes à un niveau post transcriptionnel. En effet il a été montré chez les patients que la mutation du site donneur du variant preS2/S (nt 458) était corrélée à une forte diminution de l'expression des protéines de surface, et que le variant doublement épissé de l'ARNpg augmente la réplication virale (Hass et al., 2005; Ma et al., 2009; Park et al., 2008).

Plusieurs éléments propres aux ARN viraux participent à la régulation de l'épissage du VHB : l'élément de régulation post-transcriptionnel PRE (PRE : Post-transcriptional regulatory element) qui est présent à l'extrémité 3' des ARN viraux (entre les nucléotides 1200 et 1684 du génome) et deux régions introniques inhibitrices d'épissage, ISS_L et ISS_{UL} situées respectivement aux positions 2951-3163 et 2877-2926 sur l'ARNpg (Bhanja Chowdhury et al., 2011; Heise et al., 2006; Ito et al., 2019) (Figure 27).



Figure 26 : Variants d'épissage des ARN viraux (Tiré de Sommer et Heise, 2008).

Bien que les protéines virales nécessaires à la réplication virale soient exprimées à partir d'ARNm non épissés, plusieurs variants d'épissage des ARN viraux de 3,5kb et de 2,4kb ont été décrit. Ils permettent notamment l'expression de la protéine HBSP ainsi que d'une protéine chimère entre la polymérase virale et les protéines de surface appelée P-S FP.

La région PRE est chevauchante avec l'extrémité 3' de l'enhancer I, la région codant pour HBx et l'extrémité 5' de l'enhancer II. Il est donc présent sur tous les ARN viraux (partiellement sur l'ARN HBx) et régule l'épissage mais également le transport et la stabilité des ARN viraux. Dès 1993, Huang et Liang montraient que le PRE inhibait l'épissage et ce de manière orientée (Huang and Liang, 1993). Cet élément forme deux structures tiges boucles, et leur déstabilisation par des mutations ainsi qu'un changement de position entrainent une perte de fonction (Huang et al., 2011). Toutefois le PRE contient également un élément de régulation positive de l'épissage : le SRE-1 (Splicing regulatory element 1). Il fonctionne comme un enhancer exonique d'épissage en position 5' du PRE (nt 1252-1348) et semble induire l'épissage de l'ARNpg. En effet sa délétion diminue l'expression de l'ARN SP1 (Heise et al., 2006).

En 2011, Bhanja Chowdhury et al. ont décrit la région ISS_L dans la région correspondant à l'intron du variant SP1 de l'ARNpg. Cet élément est composé de deux domaines activateurs suivis de deux domaines répresseurs. Lorsqu'il est complètement délété une augmentation de l'épissage est observée, cependant la délétion des sous-domaines activateurs induit une diminution de l'épissage. Les domaines activateurs sont fonctionnels même en présence du PRE. Les domaines inhibiteurs forment deux structures de tige-boucle et l'inhibition de l'épissage semble être majoritairement effectuée par la seconde (Bhanja Chowdhury et al., 2011)

Enfin récemment un deuxième élément répresseur a été découvert en amont de ISS_L . Cette séquence dénommée ISS_{UL} se trouve en amont de la séquence ISS_L et consiste en une structure secondaire également en forme de tige boucle fortement conservée chez les hepadnavirus. L'inhibition de l'épissage par ISS_{UL} semble être plus efficace que celle médiée par ISS_L (Ito et al., 2019).



L'épissage des ARN viraux est régulé par plusieurs régions présentes sur les ARN viraux. Les sites ISS_{UL} et ISS_L présent dans l'intron de l'ARNpg servent à inhiber l'épissage. La région PRE présente en 3' de tous les ARN viraux agit comme inhibiteur de l'épissage. Le site PRE III permet la fixation de la protéine PTB, qui inhiberait l'épissage. Le PRE contient malgré tout une région SRE stimulant l'épissage de l'ARNpg. Les protéines hLa et PSF stimulent l'épissage alors que la protéine TARDBP2 va l'inhiber.

Ces éléments structuraux peuvent fonctionner en empêchant par exemple l'accessibilité de certains sites d'épissage mais il est également probable qu'ils inhibent ou permettent le recrutement de facteurs d'épissage sur l'ARN viral dont certains ont déjà été décrit (Figure 27). Une étude prédictive a montré que le PRE contient des séquences de fixations putatives pour les facteurs d'épissage appartenant pour la plupart à la famille des SR protéines (SC35, SRp55 SRp45 et SRSF1) sans montrer leurs rôles sur l'épissage des ARN viraux (Sommer, 2008). En 2017, Duriez

et al. ont identifié les protéines se liant à l'ARNpg et obtenus 15% de protéines impliquées dans les mécanismes d'épissage. Ces travaux ont pu montrer que l'expression des protéines hLa et PTB associated splicing factor (PSF) induisait une augmentation de l'épissage viral, alors que le facteur SRSF1 lui réprimait l'épissage (Duriez et al., 2017). Des travaux préliminaires avaient déjà montré que la protéine PSF stimule l'épissage des ARN viraux et que cette augmentation était en partie contrecarrée en présence du PRE, confirmant le rôle inhibiteur du PRE dans l'épissage. PSF pourrait réguler le fonctionnement des sites 3' accepteurs d'épissage (Heise et al., 2006). La protéine *polypyrimidine tract-binding protein* (PTB) dont un des rôles connus est d'inhiber l'épissage possède également un site de fixation en 3' du PRE. Cette fixation régule l'export des ARN non épissés mais pourrait également inhiber l'épissage (Zang et al., 2001).

Récemment les travaux de Makokha et al. cités précédemment ont montré que la protéine TARDBP régule l'expression du promoteur preC/C mais également que ce facteur pouvait se fixer à l'ARNpg dans la région 3' non codante et inhibe son épissage (Makokha et al., 2019).

Enfin il semble que les facteurs régulant l'épissage d'HBV soient foies et espèce spécifiques, car l'épissage est diminué lors de l'expression des ARN viraux dans des cellules autres que les hépatocytes, ou bien dans des hépatocytes provenant de souris (Ito et al., 2019). L'expression de ces facteurs pourrait être augmentée en cas de pathologie hépatique, amenant à une surreprésentation des formes épissées à des stades plus tardifs de la maladie (Duriez et al., 2017).

Les processus régulant l'épissage du VHB sont donc complexes et font intervenir des facteurs ou des séquences inhibants ou augmentant l'expression des formes épissées. Ayant réussi à contourner les voies de l'épissage, les ARN viraux doivent ensuite être exportés vers le cytoplasme pour pouvoir s'exprimer.

2. Export des ARN viraux

Afin d'atteindre le cytoplasme pour être transcrit, les ARN viraux doivent passer à travers le NPC et ce passage ne se fait pas passivement. Chez les eucaryotes, deux voies majoritaires permettent l'export des ARNm. La première voie implique l'hétérodimère NFX1/NXT1 (Nuclear export factor 1/ NTF2-related export protein 1) qui va se fixer directement aux ARN polyadénylés et permettre l'export de ces derniers par association avec le complexe Transcription-Export complex 1 (TREX-1). La
Introduction

majorité des ARNm utilise la voie dépendante de NFX1 afin d'être exporté, mais une deuxième voie dépendant du facteur Crm1 (chromosomal maintenance 1) existe. Cette protéine est impliquée dans l'export de protéines et des ARN ribosomaux et nécessite un adaptateur protéique afin de se fixer aux ARNm et exporter ces derniers (Williams et al., 2018). Ces voies permettent l'export des ARN épissés, et donc, les ARN viraux épissés vont pouvoir être exportés correctement. Le virus utilise des mécanismes détournés afin d'exporter les ARN non épissés en l'absence d'interaction avec le spliceosome.



Figure 28 : Régulation de l'export des ARN viraux non épissés.

L'export des ARN viraux est majoritairement dépendant du complexe TREX. La protéine ZC3H18 va se fixer au niveau de la région SEP1 du PRE des ARN codant les protéines de surface ce qui va induire le recrutement de du complexe TREX et médier l'export de ces ARN. La protéine PTB est également impliquée dans l'export de ces ARN. Les protéines P15 et NXF1 vont se fixer sur l'ARNpg et recruter le complexe TREX afin de permettre son export.

L'export de l'ARNpreS2/S mais pas de l'ARNpg est dépendant de la région PRE, en effet la délétion du PRE impacte l'expression de la protéine HBs mais pas l'export des ARN de 3,5kb (Heise et al., 2006; Huang and Yen, 1994). En plus du domaine SRE décrit précédemment régulant l'épissage, le PRE contient deux domaines très conservés composés de deux tiges boucles : SLα et SLβ (SL : stem loop). En 1996, Donello et al. confirment tout d'abord que ces éléments régulateurs fonctionnent indépendamment de la présence de protéines virales pour exporter des

ARN non épissés. Puis ils décrivent les deux domaines fonctionnels du PRE permettant l'export, entre les nucléotides 1151-1413 et 1352-1684 qui fonctionnent de manière synergique (Donello et al., 1996). Il semble que le PRE présent chez le WHBV, qui possède un domaine WPREy en plus des domaines SL α et SL β , soit plus efficace pour réguler l'export des ARN viraux (Donello et al., 1998). Contrairement au RRE du VIH, il est montré que l'export médié par le PRE est indépendant de la voie d'export impliquant Crm1 et de la voie exportant les ARNt (Zang and Benedict Yen, 1999). La protéine PTB se fixe sur deux sites dans la région 3' de SL β dans le domaine appelé PRE III, avec une plus grande affinité pour le deuxième site. Des mutations de ces sites inhibant la fixation résultent en une forte diminution de l'export des ARN non épissés (Zang et al., 2001). Les études montrent que la protéine PTB navigue entre le noyau et le cytoplasme de façon constante, et par ce fait pourrait entrainer avec elle les ARN viraux. Les travaux les plus récents montrent que la régulation de l'export des ARN codant les protéines de surface se fait par la fixation de la protéine Zinc finger CCCH domain-containing protein 18 (ZC3H18) sur un nouveau domaine identifié comme le SEP1 (Sub Element of PRE1) de 116 NT à l'extrémité 3' du PRE. Ce domaine fonctionne de manière orientée. La protéine ZC3H18 interagit avec le complexe d'export TREX qui est impliqué dans l'export des ARN épissés. Cependant l'export des ARN non épissés de l'herpesvirus de type 8 (HHV8), l'herpès simplex virus 1 (HSV-1) et le cytomégalovirus (CMV) dépendent également de ce complexe, indiquant que les virus sont capables de détourner cette voie pour exporter des ARN non épissés. Dans ce contexte, les auteurs ont montré que le SEP1 par son interaction avec la protéine ZC3H18 permet le recrutement des protéines du complexe TREX indépendamment de la présence du spliceosome, et induit le transport des ARN exprimant les protéines de surface (Chi et al., 2014).

L'export de l'ARNpg est également régulé par le complexe TREX. L'ARNpg interagit en effet avec le complexe NFX1/NXT1 et par cette interaction permet le recrutement du complexe TREX (incluant Aly et BAT1/DDX39). L'extinction du complexe NXF1/TAP résulte en une forte diminution de l'ARNpg. Bien que l'étude montre l'association de la protéine virale HBc avec les mêmes protéines, il semblerait que l'ARNpg soit correctement exporté en l'absence de la protéine virale (Yang et al., 2014) (Figure 28).

Ces travaux montrent que le VHB a pu détourner la voie cellulaire d'export des ARN épissés médiée par le complexe TREX afin d'exporter ses ARN non épissés. Cet

export se fait de manière dépendante du PRE pour les ARN codant les protéines de surface, par la fixation de ZC3H18 sur le SEP1, mais de façon indépendante du PRE pour l'ARNpg par l'association directe avec le complexe TREX via NXF1/TAP.

Récemment des inhibiteurs viraux qui ciblent le PRE ont montré leur efficacité pour diminuer l'expression des gènes viraux, sans affecter l'expression des gènes cellulaires.

A ma connaissance, des études sur l'export de l'ARN codant pour HBx n'ont pas encore été effectuées.

3. Stabilité des ARN viraux

Enfin un dernier niveau de régulation des ARN viraux est la stabilité de ceux-ci. Encore une fois la région PRE semble jouer un rôle très important pour stabiliser les ARN viraux. Cette région contient un domaine de fixation pour l'antigène humain La (hLa). Il s'agit d'une phosphoprotéine de liaison aux ARN qui se fixe aux ARN qui viennent d'être synthétisés et augmente leur stabilité en protégeant les extrémités 3' de la dégradation par les exonucléases. La fixation de hLa se fait sur un domaine chevauchant avec le SRE, cité précédemment pour son rôle dans l'épissage (Figure 29) (Heise et al., 1999). La régulation des deux domaines pourrait être compétitive et d'après les travaux de Sommer, 2008, la surexpression de hLa entrainerait une diminution de l'épissage (Sommer, 2008). Cependant des données plus récentes ont montré une augmentation significative de l'épissage lors de la surexpression de hLa (Duriez et al., 2017). hLa va se fixer sur tous les ARN viraux sur une tige boucle au sein d'un domaine de 91nt dans le PRE et cette fixation est dépendante de cette structure et non pas de la séquence qui la constitue. La demi-vie de tous les ARN viraux est diminué lors de la déstabilisation de cette structure (Ehlers et al., 2004). Lors de l'induction par les cytokines, la protéine hLa va subir un clivage protéolytique. Cette fragmentation corrèle avec une diminution du niveau d'ARN dans les hépatocytes de souris transgéniques pour HBV (Heise et al., 1999). La protéine hLa est activée par phosphorylation de la serine 366. Des travaux plus récents ont confirmé le rôle de hLa grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de la kinase réalisant cette phosphorylation et ont également montré que la protéine phosphorylée était surexprimée dans des biopsies de foies infectés par le virus (Tang et al., 2013). Heise et al., ont également caractérisé les évènements induisant la déstabilisation de l'ARN en absence de la protéine hLa et montré une digestion spécifique des ARN viraux au niveau du site de fixation de hLa lors de l'activation de l'inflammation dans les foies de souris répliquant le virus (Heise et al., 2001). Ces résultats indiquent que le PRE, par l'intermédiaire de la fixation de la protéine hLa joue un rôle important dans la régulation de la stabilité des ARN viraux. L'utilisation d'inhibiteurs de la protéine hLa est également une piste étudiée afin de traiter les patients (kang et al 2015 et Tang et al 2012).

La stabilité de l'ARNpg est médiée par la protéine RNA binding protein 24 (RBM24) qui se fixe en 3' et en 5' dans la région répétée de l'ARNpg (Figure 29). Il s'agit d'une protéine multifonctionnelle impliquée dans l'épissage, la stabilité et l'export des ARNm. La fixation en 3' permet la stabilisation de l'ARNpg et celle en 5' aurait pour effet d'empêcher la traduction de la protéine de capside. L'étude a montré que la balance de l'expression de RMB24 est très importante car à la fois son extinction et sa surexpression conduisent à une diminution de la réplication virale (Yao et al., 2018). Des travaux plus récents de la même équipe ont montré que RBM24 était impliquée dans l'encapsidation de l'ARNpg en augmentant l'interaction entre la polymérase et la séquence ε. Cette action pourrait avoir un effet sur la stabilité de l'ARNpg, en



Figure 29 : Régulation de la stabilité des ARN viraux non épissés

La protéine hLa qui se fixe dans le PRE prévient la digestion des ARN viraux par les RNases. Les ARN viraux sont également la cible du complexe exosome ARN qui va être recruté par l'intermédiaire des facteurs SKIVL2, AID et Prdx1 et induire leur dégradation. La protéine RBM24 est recrutée à l'extrémité de l'ARNpg et permet de stabiliser celui-ci.

augmentant son encapsidation et donc en le protégeant de l'action des nucléases (Yao et al., 2019).

Enfin, la voie de dégradation des ARN par le complexe exosome ARN pourrait cibler certains ARN viraux. Cette voie est impliquée dans la dégradation des ARN, dans le noyau et dans le cytoplasme et fait intervenir différentes sous-unités suivant sa localisation. Elle permet de reconnaitre les ARN aberrants, ayant des structures secondaires anormales ou bien des codons Stop mal positionnés ou absent et va induire leur digestion dans la direction 3'-5'. En 2015, Liang et al., ont montré que l'inhibition de la réplication virale par le facteur *transforming growth factor-* β (TGF β) était médié par l'augmentation de l'expression de la cytidine désaminase AID (Activation-induced cytidine desaminase). La diminution de la réplication virale n'est pas liée à l'activité cytidine désaminase de la protéine mais à la formation d'un complexe entre Exosome component 3 (Exosc3), AID et la protéine virale HBVpol. Par son association avec la séquence ε à l'extrémité 3' de tous les ARN, HBV pol va entrainer le recrutement de l'ARN exosome qui va digérer les ARN viraux (Figure 29) (Liang et al., 2015). Un peu plus tard, il a été montré que la voie d'ARN exosome cible également les ARN viraux en absence d'HBV Pol. Les auteurs ont montré que la machinerie de traduction était recrutée à l'extrémité 3' de l'ARN de 0,8kb et pouvait initier la traduction à partir du codon start d'HBe. En l'absence de codon stop à l'extrémité 3' de l'ARN la machinerie Non-Stop mediated RNA decay induit le recrutement de l'exosome et la dégradation des ARN. Cette interaction est médiée par la liaison des protéines SKIV2L (superkiller viralicidik activity 2 like) qui interagi avec l'ARN d'HBx et Exosome component 4 et 5 (Exosc4 et Exosc5) (Aly et al., 2016). Enfin récemment, il a été montré que la protéine HBx interagit avec la protéine peroxiredoxin 1 (Prdx1). Ce nouvel interactant se fixe également sur les ARN viraux, à leur extrémité 3', et interagit avec Exosc5 induisant la dégradation des ARN viraux (Deng et al., 2019) (Figure 29).

Pour résumer nous avons pu voir que les mécanismes de régulation transcriptionnelles et post-transcriptionnelles sont finement régulés afin de permettre aux gènes viraux de s'exprimer. Les différents promoteurs viraux et les enhancers permettent le recrutement de nombreux facteurs de transcriptions, qui pour beaucoup sont des facteurs foies spécifiques, ce qui permet au virus d'augmenter sa spécificité hépatotropique. Comme les gènes cellulaires, l'expression des gènes viraux est soumise à la régulation par des mécanismes épigénétiques. Les facteurs impliqués dans la reconnaissance de l'ADN non méthylé, comme Cfp1, vont par exemple permettre d'activer la transcription. En présence d'HBx il a été montré que l'ADNccc est associé à un environnement épigénétique. En revanche, en son absence, on note l'apparition de marques répressives corrélée à une diminution de l'expression des gènes. Les mécanismes de régulation post-transcriptionnelles sont également primordiaux pour l'expression des gènes viraux. La région 3' des ARN correspondant à une séquence appelée PRE semble réguler très finement les étapes d'épissages, d'export et de stabilité des ARN. Les gènes viraux étant majoritairement non épissés, des régions inhibitrices d'épissage ont été mise en évidence dans les introns. Par la suite, bien que non épissés, il semble que les ARN soient exportés vers le cytoplasme par le complexe TREX. Le recrutement du complexe se fait grâce à des interactions avec des protéines différentes pour l'ARNpg et pour les ARN codants les protéines de surface. Enfin la stabilité des ARN est médiée par une protection par la protéine hLa qui empêche la digestion par des endonucléases, bien qu'il ait été montré que les ARN viraux soient ciblés par la voie des exosomes.

4. <u>Régulation de la biologie des ARN viraux</u> par la protéine HBc.

Afin de pouvoir correctement se répliquer et se propager, le VHB a établi des stratégies originales. Etant donné la petite taille de son génome et le peu de protéines codées par le virus il n'est pas étonnant que ces protéines aient une fonction pléiotropique. La polymérase virale par exemple en plus de réaliser la synthèse des brins d'ADN possède une fonction inédite d'amorçage protéique. La protéine HBx joue de multiples rôles, tant par une régulation épigénétique que par la dégradation de certains facteurs. La protéine HBc, en plus de son rôle dans la formation des capsides, régule les étapes de maturation de l'ARN RC, les étapes d'export des particules en dehors de la cellule et les étapes d'import des particules au noyau. Curieusement, cette protéine Se retrouve également dans le noyau des cellules infectées. Bien que la protéine HBx soit considérée comme la protéine régulant l'expression des gènes, il n'est pas exclu que la protéine HBc puisse également jouer un rôle dans l'expression des gènes viraux. En effet, la protéine se retrouve associée l'ADNccc et aux histones sur le minichromosome et va certainement réguler l'expression des gènes viraux (Bock et al., 2001). Cependant son rôle dans ce contexte est toujours sujet à débat.

A. Localisation nucléaire de la protéine HBc.

La protéine HBc est localisée dans le noyau et/ou dans le cytoplasme, dans les coupes histologiques provenant de foies de patients infectés mais également dans en culture cellulaire (Akiba et al., 1987; Chu and Liaw, 1987; Michalak and Nowosławski, 1982; Petit and Pillot, 1985; Sharma et al., 2002). Il a été montré que la présence d'HBc dans le noyau est associée à un niveau élevé d'ADN dans le sérum des patients et à la phase de tolérance immune (Chu et al., 1997; Sheen et al., 2007). Les travaux ont montré que la présence d'HBc dans le cytoplasme est associée à une infection présentant une inflammation, et donc régénération des hépatocytes (Chu et al., 1995). Cette localisation cytoplasmique est également associée à un niveau faible d'ADN dans le sérum (Liu et al., 2009).

Les observations d'HBc dans le cytoplasme des hépatocytes qui se régénère sont en accord avec les observations faites par l'équipe du Pr Chisari qui a montré que la protéine se retrouve principalement dans le noyau, sauf lorsque les cellules se divisent et que la membrane nucléaire se dissocie (Guidotti et al., 1994). Il semblerait en fait que la localisation de la protéine ne soit pas influencée par la dissociation de la membrane nucléaire mais par déroulement du cycle cellulaire. La protéine est présente dans le noyau en phase G1, puis son niveau diminue lors de la phase S, et donc avant la dissociation de la membrane nucléaire. Dans les cellules guiescentes, comme en G1, la quantité d'HBc dans le noyau est élevée (Yeh et al., 1993). La protéine semble donc naviguer entre le noyau et le cytoplasme de façon active. Le CTD de la protéine permettrait de faire la navette. Dans des expériences de fusion du CTD avec l'antigène T du SV40, la protéine chimérique est capable de naviguer entre les deux noyaux d'un homocaryon (Yang et al., 2017a). Les travaux ont montré que le CTD d'HBc possédait deux NLS mais également deux signaux d'export nucléaire. Ces signaux sont retrouvés au niveau du CTD et sont très proches, ce qui peut expliquer la complexité d'étude des phénomènes de transport et certains résultats contradictoires (Figure 30) (Li et al., 2010). Comme décrit précédemment, le complexe importine α/β permet l'import des capsides dans le noyau (Rabe et al., 2003). La protéine HBc interagit directement avec l'importine β afin de permettre l'import des capsides. Encore une fois cette interaction est médiée par le CTD de la protéine qui va être exposé à l'extérieur des capsides pour les capsides matures et les capsides vides (Chen et al., 2016b). De plus les capsides virales ont été observées dans le pore nucléaire, à la face nucléaire du panier (Schmitz et al., 2010). L'interaction avec NUP153 serait responsable de la dissociation des capsides et permettrait le passage du génome à travers le panier à la face nucléaire du pore. Après cette étape, la protéine HBc est également relâchée dans le noyau (Schmitz et al., 2010). Les fonctions d'HBc sont fortement régulées par l'état de phosphorylation du CTD. Les étapes tardives de la réplication virale mais également les étapes d'import des capsides au pore nucléaire sont régies par des phosphorylations dynamiques du CTD (Deroubaix et al., 2015; Jung et al., 2014; Kann and Gerlich, 1994; Lan et al., 1999; Selzer et al., 2015). Il a été montré que le niveau de phosphorylation de la protéine avait également un impact sur la localisation. La mutation des trois sérines des domaines SPRRR en alanines, mimant un état déphosphorylé, va induire une rétention de la protéine dans le noyau, indépendamment du cycle cellulaire (Liao and Ou, 1995). Dans le noyau, la protéine HBc pourrait être associée au nucléole, qui est un lieu de transcription très actif (Ning and Shih, 2004). Une colocalisation avec les corps PML (promyelocytic leukemia protein), qui sont associés à des sites de réparation de dommages à l'ADN, a également été décrite (Chung and Tsai, 2009). De façon intéressante, l'induction des dommages à l'ADN augmente la réplication virale (Chung and Tsai, 2009).

La protéine HBc possède deux NLS ainsi que deux NES dans le domaine C-ter riche en arginine qui régule la localisation de la protéine (Li et al., 2010). Le domaine



Figure 30 : Signaux de localisation cellulaires présent dans le domaine C-ter d'HBc.

peut être sous divisé en 4 domaines riches en arginine (ARD : Arginine Rich Domain) (Figure 30). Par des expériences de mutagenèse dirigée les auteurs ont montré que les domaineq ARD-I et ARD-III forment les deux signaux de rétention nucléaire. Les domaines ARD-II et ARD-IV forment eux les signaux d'export et les travaux montrent que le CTD peut fixer la protéine NXF1 et ainsi permettre l'export de la protéine via le complexe TREX (Li et al., 2010). La même équipe a ensuite montré qu'HBc interagit également avec la protéine NXT1 et le recrutement du complexe TREX et que ces interactions étaient renforcées en présence d'ARN et diminuées lorsque les NES étaient mutés. L'interaction de NXF1/NXT1 entraine une association avec d'autres protéines du complexe comme la protéine Aly. Ces expériences ont donc confirmé l'interaction des signaux d'export nucléaire d'HBc avec le complexe NXF1/NXT1 et le complexe TREX ainsi que le transport via ce complexe (Yang et al., 2014).

B. Homologies avec des protéines impliquées dans la régulation de l'expression des ARN.

Le domaine CTD de la protéine possède des propriétés communes avec les protéines SR, grâce à la triple répétition du motif <u>SPRRR</u>. Comme HBc, cette superfamille de protéines est caractérisée par la présence d'un domaine riche en sérine (S) et en arginine (R). Elles jouent un rôle majeur dans les mécanismes d'épissage, d'export et de stabilité des protéines (Lai et al., 2009). Il a d'ailleurs été montré que les phosphorylations d'HBc peuvent être médiées par les protéines SRPK1 et SRPK2 qui sont des kinases qui réalisent la phosphorylation des protéines SR. Bien que ces phosphorylations aient été montrées *in vitro*, elles semblent similaires à celles retrouvées *in cellulo*, à savoir sur les sites majoritaires S155, S162, et S170 (Daub et al., 2002; Heger-Stevic et al., 2018). Une étude *in cellulo* a cependant montré que ces kinases sont effectivement capables de moduler l'efficacité d'encapsidation de l'ARNpg mais que cela est indépendant de leur activité de phosphorylation. En effet l'expression d'un mutant déficient pour la phosphorylation est également capable de diminuer l'encapsidation des ARN (Zheng et al., 2005).

Le domaine CTD de la protéine très riche en arginine, et donc positivement chargé, a la capacité de se fixer aux acides nucléiques de façon séquence indépendante (Lewellyn and Loeb, 2011). Dans ce contexte la protéine pourrait agir comme chaperonne des acides nucléiques, permettant le repliement correct de l'ARNpg et facilitant sa rétrotranscription. En plus de sa composition basique, le CTD est une extrémité très flexible, ce qui est une deuxième caractéristique des protéines chaperonnes de acides nucléiques. Ceci a été observé in vitro chez E. coli et les résidus phosphorylables semblent être important pour permettre à la protéine de jouer son rôle de chaperonne (Chu et al., 2014).

C. La protéine HBc : une fonction de facteur de transcription ?

Dans le noyau, la protéine HBc pourrait être impliquée dans la régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle. Une première étude allant dans ce sens montrait dès 1999 qu'un virus DHBV muté pour la protéine core avait un niveau d'ARN bien inférieur au virus sauvage (Schultz et al., 1999). Comme cité précédemment, la protéine HBc est recrutée sur l'ADNccc, et il a été montré par digestion partielle par des nucléases que sa présence est corrélée à une diminution de l'espacement entre les nucléosomes de 10%. Les études précédentes avaient montré que la protéine se fixe de façon aspécifique sur les acides nucléiques mais les auteurs de ces travaux ont montré qu'HBc à une plus forte affinité pour l'ADNccc (Bock et al., 2001). Une étude sur des biopsies de patients a montré que ce recrutement se fait préférentiellement sur le CpGi II de l'ADNccc et que ce recrutement est positivement corrélé avec les marqueurs de la réplication virale, i.e. les niveaux d'ADN RC dans les cellules et dans les sérums des patients, mais également avec le recrutement du facteur de transcription CBP. Enfin la présence d'HBc sur le CpGi II est inversement corrélée avec la méthylation de ce site (Guo et al., 2011). HBc semble également capable d'activer la transcription de la région du promoteur preC/C et donc de l'enhancer II en augmentant la capacité de fixation du facteur NFkB sur cette région (Kwon and Rho, 2002). Une étude a été réalisée en transfectant des génomes viraux mutés pour HBc et recircularisés afin de mimer l'ADNccc. Cette étude montre qu'en absence d'HBc, ou lorsque le CTD est muté, la quantité d'ARN viraux est fortement réduite. De façon étonnante, bien que l'expression des ARN viraux soient fortement réduite, pour certains mutants utilisés dans cette étude la sécrétion de la protéine HBs ne semble pas être affectée (Chong et al., 2017). Cependant cette étude ne compare pas l'infection entre un génome sauvage et un génome déficient pour HBV, mais un génome muté pour HBc transcomplémenté ou non avec la protéine HBc ou bien des mutants de la protéine. Enfin, la protéine Np95/ICBP90-like RING finger protein (NIRF) interagit avec HBc et induit son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. De façon intéressante, cette dégradation d'HBc par NIRF est corrélée avec une diminution de l'acétylation de l'Histone H3 sur l'ADNccc, qui est une marque activatrice de la transcription (Qian et al., 2015).

La protéine core est également capable de se fixer aux gènes cellulaires et de modifier leur transcription. Dans une moindre mesure comparée à HBx, HBc est capable d'activer la transcription d'un rapporteur contenant une séquence CRE via la voie CRE/CREB/CBP (Xiang et al., 2015). D'autres études ont montré que HBc pouvait réguler négativement l'expression de certains gènes, notamment l'expression de la protéine DR5 (Death receptor 5) impliquée dans la régulation des voies apoptotiques TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Dans ce contexte, la surexpression d'HBc est capable de contrer l'effet apoptotique induit par la protéine HBx. Les tumeurs de patients infectés chroniquement montrent un niveau réduit de DR5 et dans ce contexte HBc pourrait jouer un rôle sur le maintien de l'infection chronique et le développement du CHC (Du et al., 2009). Récemment, il a été montré que HBc interagit avec la protéine hBRM-associated factor 200 (BAF200) et que cela induisait une diminution de l'expression de la protéine Interferon-induced transmembrane protein 1 (IFITM1). Par cette interaction, HBc est capable d'inhiber partiellement la restriction induite par les interférons afin d'améliorer la réplication virale (Li et al., 2019). Enfin, une analyse génomique par immunoprécipitation (ChIP-on-ChIP) a identifié environ 3100 promoteurs sur lesquels la core pouvait se fixer, cependant sans associer cela avec une modification de leur expression (Guo et al., 2012).

Ces résultats semblent indiquer qu'HBc joue un rôle sur la transcription virale mais aussi sur l'expression des gènes cellulaires, en se fixant directement sur les promoteurs ou par association avec des facteurs de transcription, cependant plusieurs études contredisent ces données. En 2014, Zhang et al., ont utilisé le système de transfection du génome recircularisé en délétant le codon start d'HBc et n'observent pas de différences avec le génome sauvage (Zhang et al., 2014). Plus tard les travaux de Qi et al. sur l'identification d'HBV Pol κ , montrent que lors d'une infection par un virus déficient pour HBc la sécrétion de l'antigène HBs est équivalents à celle du virus sauvage. Cependant dans cette dernière étude, la réplication virale est seulement mesurée par la quantification de la sécrétion de l'antigène HBs et les auteurs ne s'intéressent pas la quantification des autres ARN viraux (Qi et al., 2016).

D. Régulation post transcriptionnelle par la protéine core.

Au-delà de son rôle dans la transcription virale ou cellulaire, HBc pourrait jouer un rôle sur les étapes post transcriptionnelles.

HBc pourrait jouer un rôle sur l'étape d'épissage des ARN viraux. En effet, dans les infections par le virus DHBV, la protéine D-HBc a été décrite dans des focis associés à des compartiments riches en facteurs d'épissages, et certains de ces focis sont également associés à la transcription virale et donc la présence d'ADNccc, suggérant qu'HBc pourrait avoir un rôle dans la régulation de l'épissage (Mabit et al., 2003). La présence de la protéine à un niveau élevé dans le noyau a également été associée à un niveau élevé du variant d'épissage SP1 (Sheen et al., 2007).

Enfin, Le CTD de la protéine core contient deux NLS et deux NES, et les expériences utilisant des systèmes d'hétérocaryon ont montré que la protéine naviguait entre les deux compartiments (Li et al., 2010; Yang et al., 2017a). La protéine interagissant également avec les acides nucléiques, elle pourrait médier le transport des ARN viraux. Les études ont montré que la protéine n'est pas nécessaire pour l'export de l'ARNpg (Yang et al., 2014). Cependant les mécanismes d'export de l'ARNpg et des autres ARN viraux semblent être différents, et il est possible qu'HBc soit alors impliqué dans l'export des ARN codant pour les protéines de surface ou de l'ARN codant pour la protéine HBx.

Pour résumer, nous avons pu voir que lorsque la protéine HBc était majoritairement retrouvée dans le noyau des cellules infectées, cela correspondait à une réplication élevée du virus. Dans ce contexte HBc est recruté sur l'ADNccc et diminue l'espacement entre les nucléosomes, et sa présence est également associée à un état permissif pour la transcription. Bien que certaines études soient contradictoires concernant le rôle précis d'HBc dans ce contexte, les études tendent à suggérer que la protéine HBc joue un rôle sur la transcription virale, mais pourrait également réguler les étapes post-transcriptionnelles.

Dans ce contexte, le développement des inhibiteurs de capsides qui viseraient également à modifier la localisation de la protéine pourrait avoir un impact majeur sur la réplication virale, ciblant d'autres étapes de la réplication.

Résultats

Résultats

Partie I : Etude des virus déficients pour la protéine HBc

Contexte

La réplication du VHB est fortement liée à la biologie de l'ARNpg. Sa transcription, son export et sa stabilité vont être des points-clés permettant d'assurer la formation de nouvelles particules virales dans le cytoplasme. Il est donc nécessaire aujourd'hui de bien comprendre ces mécanismes ainsi que la régulation de l'ADNccc afin de pouvoir cibler ces étapes du cycle viral et développer de nouveaux traitements. La protéine HBc est présente dans le noyau, associée à l'ADNccc, mais son rôle dans ce contexte est encore sujet à controverse.

Le projet principal de ma thèse était d'étudier le rôle d'HBc sur la transcription et la stabilité des ARN viraux. Pour cela nous avons construit plusieurs mutants déficients pour l'expression de la protéine, en insérant des codons STOP précocement dans la séquence d'HBc. Nous avons eu l'opportunité d'utiliser un plasmide construit pour une étude précédente par Q. Deng (Deng et al., 2009) que nous avons par la suite modifié. Ce plasmide code pour 1.3 copies du génome viral dans lequel 323 nucléotides ont été délétés dans la séquence codant pour HBc et remplacés par une séquence de 180 nucléotides codant des épitopes dont l'épitope Flag, en phase avec le cadre de lecture d'HBc. La protéine de fusion produite rHBc contient les 27 premiers acides aminés d'HBc fusionnés à ces épitopes puis les 48 derniers acides aminés d'HBc. De plus ce plasmide code pour la protéine HBc sauvage sous le contrôle du promoteur SV40 permettant la production de particules virales. L'avantage de cette construction est de contenir sur le même plasmide le génome muté pour HBc ainsi que la séquence permettant l'expression de la protéine HBc en parallèle augmentant le rendement de production virale.

A partir de ce plasmide, j'ai construit différents mutants. Tout d'abord le <u>prHBV1.3HBc-Flag27*/HBc</u>, en insérant deux codons stop afin d'abolir l'expression de la protéine recombinante rHBc. Ces codons ont été insérés en amont de la séquence codant le polyépitope et donc inhibent l'expression de la protéine, notamment du CTD d'HBc qui contient la région riche en arginine, connue pour ses capacités de liaison aux acides nucléiques. Afin de ne pas interférer avec des séquences d'ADN régulatrices telles que la tige boucle ε ou bien le signal de polyadénylation, les codons stop ont été insérés au 81^e nucléotide dans la séquence d'HBc, aboutissant à l'expression d'une protéine HBc tronquée très précocement (27AA). Afin de se rapprocher au maximum de la séquence sauvage du virus, j'ai également construit un

plasmide <u>pHBV1.3HBc-27*/HBc</u>, où la séquence sauvage a été réintroduite dans le plasmide puis des codons stop ont été ajoutés aux mêmes nucléotides (81^e). Les virus produits par ces deux plasmides ont pu être étudiés de façon approfondie. Enfin dernièrement, j'ai réalisé des constructions dans lesquelles le codon stop a été déplacé le long du cadre de lecture d'HBc, après les codons 38 ou 67 du gène d'HBc afin d'étudier l'impact de la position du codon stop sur la biologie des ARN viraux.

Ces différentes constructions plasmidiques vont permettre la production de virus déficients pour l'expression d'HBc et vont donc nous permettre d'étudier le rôle d'HBc sur la transcription et la biologie des ARN viraux.



Figure 31 : Production de virus déficients pour HBc.

Le plasmide prHBV1.3HBc-Flag27*/HBc code pour un ARNpg dans lequel 323 nucléotides du gène HBc ont été substitués par une séquence codant pour des épitopes. Deux codons stop ont été placés en amont de cette séquence conduisant à la production d'une protéine HBc tronquée précocement. En parallèle le plasmide code pour le gène HBc sauvage sous le contrôle d'un promoteur SV40. Une fois transfecté dans les cellules HepG2 le plasmide va permettre l'expression d'un ARNpg déficient pour HBc qui sera encapsidé grâce à la protéine sauvage codée en trans, aboutissant à la sécrétion de particules infectieuses déficientes pour la production d'HBc.

Comme présenté dans la Figure 31, afin de produire du virus infectieux, ces plasmides sont transfectés dans des cellules HepG2 et grâce à l'expression de la protéine HBc sous le contrôle du promoteur SV40, ils vont permettre la production de virus infectieux, mais dont le génome encapsidé est incapable de coder pour la

protéine HBc. Ce virus sera ensuite récupéré dans le surnageant et concentré pour permettre l'infection des cellules permissives au VHB et les différentes étapes du cycle viral ont été étudiées.

A. Etude du mutant HBV HBc-Flag27*

1. Etude de l'expression du plasmide prHBV1.3HBc-Flag27*/HBc.

Avant d'étudier le rôle d'HBc sur la biologie des ARN viraux, nous avons voulu vérifier que le plasmide prHBV1.3HBc-Flag27*/HBc permet une expression correcte des différents marqueurs viraux lorsqu'il est transfecté dans les cellules HepG2 afin de produire le virus. Pour cela nous avons transfecté des cellules HepG2 avec le plasmide payw1.2 exprimant le génome sauvage ou bien le plasmide prHBV1.3 HBc-Flag27*/HBc permettant l'expression d'un génome viral déficient pour HBc ainsi que la protéine HBc sauvage (Figure 32A). 3 jours après transfection, nous n'observons pas de défaut majeur d'expression des ARN viraux après analyse par northern blot (Figure 32B). Nous avons également confirmé par western blot que la protéine HBc qui est exprimée sous le contrôle d'un promoteur SV40 pour le plasmide prHBV1.3 HBc-Flag27*/HBc était exprimé au même niveau que la protéine HBc produite que par transfection du plasmide payw1.2 (Figure 32C). La protéine HBx est très importante pour réguler toutes les étapes du cycle viral, depuis la transcription jusqu'à la sécrétion du virus, nous avons donc contrôlé son expression par western blot après transfection et observé que la protéine HBx est correctement exprimée dans les lignées transfectées (Figure 32C). Enfin nous avons vérifié que le virus était correctement sécrété. Pour cela nous avons récupéré les surnageants des cellules transfectées et quantifié l'ADN RC présent dans ces surnageants. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de différences significatives entre la production virale par le plasmide payw1.2 et le plasmide prHBV1.3 HBcFlag27* (Figure 32D). Ces contrôles nous ont permis de valider ce modèle de production virale.



Figure 32 : Etude de l'expression du plasmide prHBV1.3HBc-Flag27*/HBc.

A) Présentation schématique des plasmides payw1.2 et prHBV1.3HBc-Flag27*/HBc permettant respectivement l'expression des virus HBV WT et HBV HBc-Flag27*/HBc- Les plasmides ont été transfectés dans des cellules HepG2. Trois jours après transfection, les ARN viraux ont été spécifiquement analysés par Northern-Blot. Les ARN viraux dans les cellules HepaD38 exprimant stablement le génome d'HBV ont été utilisés comme témoin positif (B). L'expression des protéines virales a été suivie par western blot avec des anticorps spécifiques dirigés contre la protéine HBc, la protéine HBx et la tubuline qui sert de témoin de charge (C). Les surnageants des cellules transfectées ont été récoltés et les ADN contenus dans ces extraits ont été analysés par qPCR avec une gamme étalon du plasmide payw1.2 et des amorces spécifiques de l'ADN RC puis rapportés à la production du virus HBV WT. Les barres d'erreur représentent la SEM de 3 expériences indépendantes. (D)

Analyse de la production virale HBV HBc-Flag27*.

Il a été reporté que la production de virus en culture cellulaire pouvait aboutir à la sécrétion de particules défectives non enveloppées : des capsides avec ou sans ADN. Ce phénomène pourrait être amplifié lors de la production du virus avec la protéine HBc exprimée à partir d'un autre promoteur que le promoteur interne du virus (expression *en trans*). Nous avons donc analysé la production de particules défectives

par ultracentrifugation sur gradient de iodixanol puis récolté les fractions correspondant à différentes densités afin de les analyser (Figure 33).



Figure 33 : Analyse des productions virales par gradient de iodixanol.

Après avoir quantifié les génomes viraux dans chaque fraction, nous avons pu mettre en évidence une fraction de génomes associés à des particules de hautes densités seulement dans la production de virus HBV HBc-Flag27* (Figure 33A). Nous avons analysé la présence des protéines de surface HBs et de la protéine HBc dans chaque fraction de la production virale HBV HBc-Flag27* par dot-blot et révélation par des anticorps spécifiques de chaque protéine. Nous avons ainsi mis en évidence que ces particules de haute densité contenant de l'ADN sont associées à des protéines de capsides, mais dépourvues d'HBs aux densités supérieures à 1,19g/ml et correspondent donc à des particules non enveloppées. Nous observons également une surproduction de particules vides, sans ADN et non enveloppées aux densités comprises entre 1,16 et 1,19g/ml (Figure 33B). Les stocks de virus HBV HBc-Flag27* contiennent donc un excès de particules défectives non enveloppées, ainsi que de capsides vides non enveloppées.

Les productions virales HBV WT et HBV HBc-Flag27* ont été déposées sur un gradient de iodixanol puis ultracentrifugées un rotor SW41-Ti à 40 000rpm pendant 16h afin de séparer les différentes populations sous virales. Le gradient a été séparé en 25 fractions égales. **A)** Analyse des quantités d'ADN-RC dans chaque fraction pour les virus par qPCR. **B)** Analyse des protéines virales et de l'ADN RC dans les fractions virales de la production virale HBV HBC-Flag27*. La présence des protéines d'enveloppe et de capsides a été analysée par dot-blot et révélée avec des anticorps spécifiques.

Quantification de l'ADNccc lors des infections par le virus HBV WT ou HBV HBc-Flag27*

Afin d'éviter que les particules défectives non enveloppées n'interfèrent avec l'infection, nous avons récupéré les fractions correspondant aux particules infectieuses (i.e. 1.13-1.15g/ml sur la Figure 33). Nous avons également purifié le virus sur des colonnes d'héparines. En effet la protéine L-HBs a une grande affinité pour l'héparine et seuls les virions enveloppés vont rester sur la colonne, ce qui permet d'éliminer les particules non enveloppées (Liu et al., 2018b; Zahn and Allain, 2005). En parallèle, nous avons concentré le virus par ultracentrifugation sur coussin de sucrose 20%, qui est la technique de purification utilisé en routine au laboratoire. Nous avons quantifié l'ADNccc dans les cellules 8 jours après infection par le virus HBV WT ou HBV HBc-Flag27* purifié des différentes façons et nous en avons conclu que les quantités d'ADNccc sont égales après infection par les deux virus peu importe la technique de purification (Figure 34).



Figure 34 : Quantification de l'ADNccc après infection par le virus VHB HBc-Flag27*.

Les cellules HepG2-NTCP ont été infectées à une MOI de 100 génomes équivalents par cellule avec le virus HBV WT ou HBV HBc-Flag27* purifiés par gradient de iodixanol (A), sur colonne d'héparine (B) ou bien par concentration sur coussin de sucrose (C). Pour la purification par gradient de iodixanol, seules les fractions correspondant aux particules de Dane ont été utilisées. 8 jours après infection les noyaux ont été isolés par fractionnement et l'ADNccc a été quantifié par qPCR. Les barres d'erreurs représentent la SEM de 3 expériences minimum.

Ceci indique que le mutant HBV HBc-Flag27* est capable de réaliser les premières étapes du cycle viral et d'établir de l'ADNccc. Le même résultat est retrouvé lorsque le virus est concentré par ultracentrifugation sur coussin de sucrose, bien que cette technique ne permette pas de se débarrasser des particules non infectieuses (Figure 34C). Ce résultat indique que ces dernières ne semblent pas interférer avec l'infection virale.

4. Etude de la transcription du virus HBV HBc-Flag27*

La régulation de la biologie des ARN est un facteur déterminant pour la réplication virale. En effet l'ARNpg une fois encapsidé sert de matrice à la formation de l'ADN-RC et donc à la formation de particules infectieuses. Nous avons donc quantifié par RT qPCR les ARN viraux après infection par du virus HBV WT ou déficient pour HBc concentré par ultracentrifugation sur coussin de sucrose 20%. A des temps courts, jusqu'à 3 jours après infection, nous n'observons pas de différence entre les deux virus (Figure 35A). En revanche lorsque l'on étudie l'infection à des temps plus longs, on observe une réduction significative des ARN viraux pour le virus muté. Cette observation est également faite 8 jours post infection lorsque le virus est purifié par ultracentrifugation sur colonne d'héparine (Figure 35B et C). Ces données montrent que les infections sont comparables peu importe la technique de purification. Nous avons donc réalisé toutes les expériences suivantes avec du virus concentré par ultracentrifugation sur coussin de sucrose 20%.



Figure 35 : Analyse de l'expression des transcrits viraux lors d'une infection HBV HBc-Flag27*.

Les cellules HepG2-NTCP ont été infectées à une MOI de 100 génomes équivalents par cellule avec le virus HBV WT ou HBV HBc-Flag27*. Les ARN ont été extraits puis analysés par RT-qPCR avec des amorces ciblant tous les ARN viraux. **A)** Cinétique d'expression des ARN viraux totaux jusqu'à 10 jours après infection avec du virus concentré par ultracentrifugation sur coussin de sucrose. **B)** Analyse des ARN totaux 8 jours après infection avec du virus purifié par gradient de iodixanol. Les fractions correspondant aux particules de Dane ont été utilisées **C)** Analyse des ARN totaux 8 jours après infection avec du virus purifié sur des colonnes d'héparines. Les barres d'erreurs représentent le SEM de 3 expériences minimum. *** P value < 0.0001, ** P value < 0.001, * P value < 0.05.

Les amorces utilisées ici ciblent la région 3' chevauchante des ARNm viraux et ne permettent donc pas de discriminer les ARN viraux. Nous avons souhaité savoir si

79

les quantités de tous les ARN viraux étaient impactés de la même façon. Pour cela nous avons analysé les transcrits viraux 8 jours après infection par qPCR et par Northern Blot, et nous pouvons observer que tous les ARN viraux sont impactés et que l'on observe une diminution d'environ 10 fois dans la quantité d'ARN viraux (Figure 36A et B). Nous avons quantifié la forme épissée de l'ARNpg, l'ARN SP1, 8 jours après infection afin de voir si les ARN épissés étaient touchés de la même façon par cette diminution. Nous pouvons voir que l'expression des ARN épissés est également diminuée d'un facteur 10. Nous avons également quantifié la sécrétion de l'antigène HBs dans le surnageant des cellules infectées par ELISA à différents temps après infection. Bien que l'expérience n'ai été réalisé qu'une seule fois, nous observons que la sécrétion d'HBs est fortement diminué lors de l'infection par le virus HBV HBc-Flag27* à partir de 8 jours après infection et semble suivre la même tendance que les quantités d'ARN totaux (Figure 36D).



Figure 36 : Caractérisation du défaut d'ARN viraux après infection par le VHB HBc-Flag27*.

Les cellules HepG2-NTCP ont été infectées à une MOI de 100 génomes équivalents par cellule avec les virus HBV WT ou HBV HBc-Flag27* concentrés par ultracentrifugation sur coussin de sucrose 20%. Les ARN ont été extraits 8 jours après infection et analysés par RT-qPCR avec des amorces ciblant les ARN totaux (A) ou de l'ARN épissé SP1 (B) ou par Northern Blot avec des sondes spécifiques du VHB (C). La quantité d'HBs-Ag dans le surnageant des cellules infectées a été quantifié par ELISA.*** P value < 0.0001 Les barres d'erreurs représentent la SEM de trois expériences indépendantes. Le dosage d'HBs-Ag ne montre qu'un seul répliqua.

Résultats

Enfin, nous avons également confirmé ce défaut du niveau d'expression des ARN viraux dans des hépatocytes primaires humains (PHH : *primary human hepatocyte*) 8 jours après infection. L'ADNccc a été quantifié après infection avec du virus purifié sur colonne d'héparine. Bien que nous n'ayons pu réaliser qu'un seul réplica pour cette quantification, l'infection par les deux virus et le niveau d'ADNccc semble être comparable (Figure 37A). Comme lors des infections dans les HepG2NTCP nous observons le défaut d'expression des ARN du VHB, confirmant nos résultats pour le virus HBV HBc-Flag27* (Figure 37B et C).



Figure 37 : Infection de PHH avec le virus HBV HBc-Flag27*

Les hépatocytes primaires humains ont été infectés à une MOI de 500 génomes équivalents par cellule par du virus purifié sur colonne d'héparine ou concentré par ultracentrifugation sur coussin de sucrose 20%. 8 jours après infection, l'ADNccc a été quantifié par qPCR **(A)** et les ARN par RT-qPCR **(B-C)**. Les barres d'erreur représentent la SEM de deux expériences indépendantes.

5. Etude de la transcription des ARN naissants.

Un défaut du niveau d'ARN peut être causé par un défaut de transcription, de transport vers le cytoplasme, ou encore un défaut de stabilité. Afin de voir si HBc joue sur la transcription de l'ADNccc nous avons quantifié les ARN naissants par la technique de *Click-IT nascent RNA*. Cette technique permet l'incorporation de ribonucléotides modifiés lors de la transcription (Ethynyl-Uridine, EU) afin de purifier et quantifier par la suite les ARN qui viennent d'être transcrits. Nous avons choisi d'étudier, 8 jours après infection, un *pulse* de 1h ou de 2h avec l'EU. Après avoir purifié et quantifié spécifiquement les ARN marqués par le nucléotide modifié, nous ne



Figure 38 : Quantification des ARN naissants.

Des cellules HepG2-NTCP ont été infectées à une MOI de 100 génomes équivalents par cellule avec du virus HBV WT ou HBV HBc-Flag27*. 8 jours après infection, les cellules ont été incubées pendant 1h ou 2h avec de l'Ethynyl-Uridine (EU) puis les ARN ont été extraits. Les ARN marqués à l'EU ont ensuite été spécifiquement purifiés et quantifiés par RTqPCR avec des primers ciblant les ARN totaux viraux. Les barres d'erreurs représentent le SEM de 3 expériences indépendantes. * P value< 0,05%

sommes pas en mesure de voir une différence significative de transcription entre le virus HBV WT et le virus HBV HBc-Flag27* lorsqu'un *pulse* de 1h est effectué. En revanche après 2h d'incubation avec l'EU nous observons un défaut significatif pour le virus HBV HBc-Flag27* (Figure 38). Ces expériences nous permettent de confirmer le défaut d'expression des ARN viraux pour le virus HBV HBc-Flag27*. Un défaut léger d'expression des ARN viraux est observé après 1h d'incubation mais celui-ci est amplifié après 2 heures d'incubation. Il est possible qu'il existe un défaut au niveau de la transcription mais ces résultats suggèrent qu'un défaut au niveau de la stabilité et/ou de l'export des ARN viraux intervient également. Des expériences complémentaires notamment avec des temps de *pulse* plus court permettront de confirmer ou non l'effet au niveau de la transcription. Nous pouvons donc conclure que le virus HBV HBC-Flag27* possède un défaut dans la quantité d'ARN viraux, et que ce défaut apparait très tôt lors de l'expression de ces ARN.

HBc provenant de la particule virale est capable de se réassocier stablement sur l'ADNccc.

Nous nous sommes intéressés au fait qu'à des temps courts après infection, les deux virus ont des niveaux d'ARN semblable, alors qu'ils baissent ensuite pour le virus HBV HBc-Flag27* (Figure 35A). Bien que le virus soit déficient pour production d'HBc, au moment de l'infection, les nucléocapsides composées de 90 à 120 dimères d'HBc

sont transportées jusqu'au pore nucléaire où elles sont déstabilisées, permettant de délivrer l'ADN RC ainsi que la protéine HBc dans le noyau. Nous avons recherché si la protéine HBc sauvage provenant des capsides pouvait être recrutée précocement sur l'ADNccc.



Figure 39 : Etude du recrutement de la protéine HBc sur l'ADNccc.

Nous avons étudié le recrutement d'HBc sur l'ADNccc par Immunoprécipitation de chromatine (ChIP)-qPCR avec des anticorps spécifiques d'HBc plusieurs jours après infection par le virus HBV WT et HBV HBc-Flag27*. Comme décrit dans les travaux précédents (Bock et al., 2001; Rivière et al., 2015) nous retrouvons la présence de la protéine HBc sur l'ADNccc d'HBV WT. A des temps courts après infection, nous retrouvons la protéine HBc également sur l'ADNccc du virus déficient pour HBc et cette association semble être très stable car nous retrouvons toujours la protéine associée à l'ADNccc jusqu'à 10 jours après infection pour le virus HBV HBc-Flag27*, qui est déficient pour la production d'HBc (Figure 39). Cependant le recrutement d'HBc semble diminuer au cours du temps pour le virus HBV HBc-Flag27* alors qu'il augmente sur l'ADNccc du virus sauvage. Ces résultats nous montrent que la protéine HBc apportée par la capside virale est capable de se réassocier sur l'ADNccc dès la formation de celui-ci. Dans ce contexte, HBc pourrait jouer un rôle sur la formation de l'ADNccc ou bien sur le recrutement des protéines formant le minichromosome viral, et ainsi réguler la transcription.

Les cellules HepG2NTCP ont été infectées à une MOI de 500 génomes équivalents par cellule par le virus HBV WT ou HBV HBc-Flag27*. Le recrutement de la protéine HBc sur l'ADNccc a été analysé par ChIP-qPCR avec des anticorps spécifiques de la protéine HBc aux temps indiqués après infection. Les barres d'erreurs représentent la SEM de 3 expériences indépendantes.

Transcomplémentation du virus HBV HBc-Flag27* par la protéine HBc.

Afin d'étudier si le défaut du niveau des ARN viraux lors de l'infection par HBV HBc-Flag27* est dû à l'absence de la protéine HBc, nous avons restauré l'expression d'HBc après infection. Le lendemain de l'infection les cellules ont été transduites par des lentivirus exprimant la protéine HBc, ou bien la protéine HBx, ou les deux lentivecteurs, puis les ARN viraux ont été analysés 7 jours après transduction. Nous avons transduit la protéine HBx car la diminution de l'expression des ARN va également entrainer une diminution de l'expression d'HBx, qui permet de réguler la transcription virale. L'absence d'HBx dans les infections par le virus HBV HBc-Flag27* pourrait expliquer la diminution dans la transcription des ARN viraux. Nous avons tout d'abord vérifié l'expression des deux protéines par western blot. Nous pouvons noter que les protéines HBc et HBx sont très fortement exprimées en comparaison de leur expression lors de l'infection par HBV WT où l'on ne détecte ni HBc ni HBx bien qu'ils soient exprimés (Figure 40A). Nous avons également quantifié les ARN viraux dans les différentes conditions. La transcomplémentation par la protéine HBc lors de l'infection par le virus HBV HBc-Flag ne permet pas de retrouver le phénotype du virus HBV WT (Figure 40B). Nous pouvons même noter une légère diminution dans les quantités d'ARN viraux pour les deux virus. En revanche lorsque la protéine HBx est exprimée lors des infections, nous observons une augmentation des niveaux d'ARN de 2 fois pour le virus HBV WT et de 3,5 fois pour le virus HBV HBc-Flag27*. Cette





Des cellules HepG2-NTCP ont été infectées à une MOI de 100 génomes équivalents par cellules avec du virus HBV WT ou HBV HBc-Flag27*. 24h après infection les cellules ont été transduites par des lentivecteurs exprimant la GFP, HBc et/ou HBx. 8 jours après transduction l'expression des protéines HBc et HBx ont été analysées par Western Blot avec des anticorps spécifiques des deux protéines (A) et les ARN ont été extraits et analysés par RTqPCR avec des amorces amplifiant tous les ARN viraux (B). Les barres d'erreurs représentent la SEM de 2 expériences indépendantes. augmentation n'abolit cependant pas la différence d'expression des ARN viraux entre les deux souches virales et nous pouvons donc en conclure que le défaut du niveau des ARN viraux n'est pas dû à l'absence d'HBx. Lorsque les deux protéines sont coexprimées pendant les infections, comme lors de l'expression d'HBc seule, on note une diminution de l'expression des ARN viraux semblant indiquer qu'HBc diminue la transcription/stabilité des ARN viraux.

Ces expériences semblent indiquer que la protéine HBc n'est pas à l'origine du défaut du niveau d'expression des ARN viraux observé car nous ne restaurons pas leur expression lors de la transduction d'HBc. Cependant nous ne pouvons pas exclure que la surexpression trop importante et donc la présence de capsides trop nombreuses puisse être délétère pour l'infection (Figure 40A). Celle-ci pourrait par exemple gêner l'import des capsides dans le noyau ou bien modifier la localisation de la protéine et donc gêner la transcomplémentation. Lors de la transfection du plasmide prHBVHBc-Flag27*/HBc, lorsque HBc est exprimée à un niveau physiologique comparé au génome sauvage, nous n'observons pas de défaut dans la quantité des ARN viraux, ce qui indique qu'en présence d'HBc le défaut d'ARN n'est pas présent (Figure 32B et C). Toutefois, il également possible que le défaut puisse provenir de la présence de la mutation, qui pourrait déstabiliser les ARN viraux. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons construit un virus HBV HBc-27* également déficient pour HBc mais avec dans le fond génétique du virus HBV WT.

B. Etude du mutant HBV HBc-27*

L'étude avec le virus HBV HBc-Flag27* nous a permis d'observer que la mutation introduite dans le cadre de lecture d'HBc diminuait l'expression des ARN viraux. Aucune séquence régulatrice n'a été décrite à l'endroit de cette mutation. Face à ce résultat étonnant qui semble incriminer plutôt la substitution que l'absence d'HBc nous avons construit un plasmide pHBV1.3HBc-27*/HBc à partir du plasmide précédent. Nous avons remplacé le génome viral comportant la substitution par une séquence HBV WT et réintroduit les codons stop à la même position, au codon 27 (A). Le génome produit portera donc seulement une substitution de 4 nucléotides, et nous permettra de savoir si la large délétion d'une partie du cadre de lecture d'HBc était à l'origine du défaut observé pour le virus HBV HBc-Flag27*, mais également d'étudier le rôle d'HBc sur la transcription virale et l'expression des ARN viraux plus généralement.

Analyse de la production virale après transfection du plasmide pHBV1.3 HBc27*/HBc.

Comme précédemment nous avons tout d'abord vérifié que ce plasmide exprimait correctement tous les facteurs viraux lors de la transfection afin de produire du virus. Pour cela nous avons transfecté des cellules HepG2 avec les plasmides payw1.2 exprimant le génome sauvage et pHBV1.3HBc-27*/HBc exprimant le virus déficient pour HBc puis nous avons analysé l'expression des ARN et des protéines virales. Comme le montre la Figure 41B et C, nous observons un défaut de la quantité d'ARNpg d'environ 3 fois pour le mutant comparé aux ARN du virus sauvage lorsque nous quantifions par RT-qPCR et par Northern Blot. De façon surprenante, l'expression des ARN codants les protéines de surface (preS/S) ne semble pas être affectée (Figure 41B et C). Les observations par western blot indiquent que la protéine HBx, ainsi que la protéine HBc dont l'expression est contrôlée par le promoteur SV40 sont exprimées correctement (Figure 41D). Nous avons également vérifié pour ce virus que les particules virales avaient une morphologie correcte en les observant en microscopie électronique. Aucune différence morphologique n'a été mise en évidence entre les deux virus (Figure 41E). Enfin nous avons séquencé l'ADN viral présent dans les virions avant infection pour confirmer la présence de la mutation. Les résultats du séquençage n'ont pas mis en évidence de réversion de la mutation des codons stop, ni de recombinaison de l'ARN viral.

Ces premiers résultats suggèrent que l'introduction de stop codons ou simplement la modification de la séquence nucléotidique d'HBc pourrait moduler l'expression des ARNpg. Malgré ce défaut, la transfection du plasmide pHBV1.3HBc-27*/HBc permet une expression correcte des ARN preS/S et aboutit à la production de virus morphologiquement et génétiquement viables. Nous avons donc étudié l'infection par ce virus.





A) Présentation schématique des plasmides payw1.2 et pHBV1.3 HBc-27*/HBc permettant respectivement la production des virus HBV WT et HBV HBc-27*. Le plasmide pHBV1.3 HBc-27* possède deux codons stop après le 81^e nucléotide du gène HBc. Ces plasmides ont été transfectés dans des cellules HepG2. Trois jours après transfection, les ARN viraux ont été spécifiquement analysés par Northern-Blot (**B**) et l'ARNpg a été quantifié par RT-qPCR (**C**). Les barres d'erreurs représentent la SEM de 4 expériences indépendantes. ** P value < 0,001. L'expression des protéines virales HBc et HBx a été analysée par western blot avec des anticorps spécifiques (**D**). Les virions présents dans les surnageants ont été purifiés sur colonne d'héparine et observé au microscope électronique à transmission (**E**).

Etude de l'infection par le virus HBV1.3 HBc27* et de l'expression des ARN viraux.

Avant d'étudier le rôle d'HBc sur la biologie des ARN viraux avec le mutant HBV HBc-27* nous avons vérifié que l'infection par ce virus était comparable au virus sauvage. Pour cela nous avons quantifié l'ADNccc dans les cellules 8 jours après infection. Comme nous le montre la Figure 42A, la présence de la mutation dans le génome ne semble pas perturber les premières étapes du cycle viral et nous observons le même niveau d'ADNccc pour les deux virus.



Figure 42 : Etude de l'infection par le virus HBV HBc-27*

Nous avons alors quantifié les ARN viraux lors de ces infections (Figure 42B). Nous pouvons noter qu'à des temps courts après infection (J2), le virus HBV HBc-27* ne présente pas de différence au niveau de la quantité d'ARN totaux par rapport au virus sauvage alors que l'expression des ARN totaux est fortement diminuée à J10 après infection pour le virus HBV HBc-27*.

Nous avons ensuite cherché à caractériser plus précisément ce défaut. A 8 jours post-infection, nous avons quantifié spécifiquement l'ARNpg et observé un défaut d'environ 15 fois dans le niveau d'ARNpg (Figure 43B). Ce défaut est beaucoup plus marqué que lors de la transfection du plasmide pHBV1.3HBc-27*/HBc où l'expression de l'ARNpg était seulement réduite de 3 fois (Figure 41B et C). Ces données ont été confirmées par Northern blot après infection par les deux virus. De façon intéressante, nous observons un défaut très marqué pour l'ARNpg lors de l'infection par le virus HBV

Les cellules HepG2NTCP ont été infectées à une MOI de 100 génomes équivalents par cellule avec le virus HBV WT ou HBV HBc-27*. A) 8 jours après infection les noyaux ont été isolés par fractionnement nucléocytoplasmique et l'ADNccc a été quantifié par qPCR. B) Les ARN viraux ont été extraits aux temps indiqués et analysés par RTqPCR. Les barres d'erreurs représentent la SEM de 3 expériences indépendantes minimum ; *** P value < 0,0001.

HBc-27* ainsi qu'une diminution d'environ 2 fois dans la quantité d'ARN preS/S (Figure 43C) à jour 8 après l'infection qui va s'amplifier au cours du temps (Figure 42, à jour 10 après infection).



Figure 43 : Caractérisation du défaut présent chez le virus HBV HBc-27*

Les cellules HepG2NTCP ont été infectées à une MOI de 100 génomes équivalents par cellule avec le virus HBV WT ou HBV HBc-27*. Les ARN ont été extraits 8 jours après infections et les ARN totaux (A) et l'ARNpg (B) ont été analysés par RT-qPCR et par Northern blot (C). Les barres d'erreurs représentent la SEM de 3 expériences indépendantes minimum ; *** P value < 0,0001 ; ** P value <0,001. Les cellules infectées ont été observées au microscope à épifluorescence 8 jours après infection après marquage spécifique des protéines virales HBs (Rouge), HBc (Vert) et des noyaux (DAPI) avec un objectif x63 (D).

Nous avons également visualisé par immunofluorescence l'expression d'HBs et nous pouvons voir que la quantité d'HBs dans les cellules positives pour HBs semble être plus faible, confirmant la diminution d'HBs sans en abolir cependant l'expression (Figure 43D). Une quantification par FACS sera nécessaire afin de quantifier le pourcentage de cellules infectées et l'expression d'HBs. Une quantification de la sécrétion d'HBs par ELISA peut également être envisagée.

Ces résultats indiquent que l'absence d'HBc amplifie le défaut d'expression des ARNpg précédemment observé lors de la transfection mais impacte également les ARN codants pour les protéines de surface. Le défaut observé peut avoir une origine transcriptionnelle mais également post-transcriptionnelle agissant au niveau du transport ou de la stabilité des ARN viraux. Dans un premier temps nous avons étudié le transport des ARN vers le cytoplasme.

Le défaut d'expression des ARN viraux du virus HBV1.3 HBc27* est déjà présent dans le noyau.

Comme montré pour le VIH, un défaut dans l'étape de transport des ARN viraux du noyau vers le cytoplasme va aboutir à l'accumulation des ARN dans le noyau (Malim et al., 1989). Il a été montré que la protéine HBc possédait à la fois les signaux de localisation nucléaire et cytoplasmique, et fait donc la navette entre les deux compartiments (Yang et al., 2017a). Nous avons donc recherché si la diminution observée lors de l'infection est due à un défaut de transport des ARN viraux vers le cytoplasme, nous avons réalisé un fractionnement nucléocytoplasmique et analysé l'expression des ARN totaux et des ARNpg 8 jours après infection par le virus HBV WT et HBV HBc-27*. Comme le montre la Figure 44, nous retrouvons le même défaut lorsque nous quantifions les ARN dans le noyau et dans le cytoplasme, pour les ARN viraux ne s'accumulent pas dans le noyau et que le défaut observé ne provient pas d'un défaut





Les cellules HepG2NTCP ont été infectées à une MOI de 100 génomes équivalents par cellule par les virus HB WT et HBV HBc-27*. 8 jours après infections les noyaux ont été séparés des cytoplasmes et les ARN ont été extraits des deux fractions. Les ARN viraux totaux et l'ARNpg ont ensuite été quantifiés par RT-qPCR. Les barres d'erreur représentent la SEM de 3 expériences indépendantes. N+C : Noyau+Cytoplasme; N : noyau; C : Cytoplasme

91

de transport des ARN. Le défaut peut donc provenir d'un défaut de transcription ou de stabilité des ARN viraux.

4. Transcomplémentation du virus HBV HBc-27* par la protéine HBc.

Puisque nous observons un défaut plus important sur la quantité d'ARNpg dans le contexte de l'infection avec le virus HBV HBc-27*, ainsi qu'une diminution des ARN preS/S, nous avons re-exprimer la protéine HBc après infections afin de déterminer si l'on peut restaurer le niveau des d'ARN viraux. Afin d'éviter une surexpression trop importante, nous avons utilisé un lentivecteur exprimant HBc sous le contrôle d'un promoteur eF1- α qui est un promoteur plus faible que le promoteur CMV utilisé précédemment.

Figure 45 : Transcomplémentation par HBc lors de l'infection par HBV HBc-27*

Nous observons que l'expression d'HBc lors de l'infection HBV HBc-27* augmente de deux fois la quantité d'ARNpg mais ne parvient pas à restaurer le niveau de l'infection HBV WT (Figure 45).

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ce résultat. Il est possible que le niveau d'expression de la protéine HBc influe sur l'expression des ARN viraux et que celui-ci doive être finement régulé ou que les cellules infectées soient plus difficilement transduites ce qui mènerait à une transcomplémentation moins efficace.

Cependant nos données suggèrent que nous observons ici deux effets : un effet dépendant d'HBc puisque HBc augmente de deux fois l'expression des ARNpg et

Les cellules HepG2 NTCP ont été infectées par HBV WT ou HBV HBc-27* à une MOI de 100 génomes équivalents / cellule. 24 après infection, les cellules ont été transduites par un lentivecteur exprimant la protéine HBc sous le contrôle d'un promoteur eF1α. 8 jours après infection l'ARNpg a été quantifié par RT-qPCR. Les barres d'erreur représentent la SEM de deux expériences indépendantes

également un effet indépendant d'HBc qui n'est pas restauré par HBc. Ce défaut de l'expression des ARNpg est déjà observé lors de la transfection du plasmide pHBV1.3HBc-27*/HBc alors que la protéine HBc est exprimée. Les résultats de transfection et d'infection suggèrent que cet effet indépendant d'HBc pourrait être post-transcriptionnel. La modification de la séquence ou l'introduction de codons stop en amont du codon naturel pourrait impacter la stabilité des ARN viraux.

L'activité dépendante d'HBc n'est quant à elle pas spécifique pour l'expression de l'ARNpg car on l'observe également sur l'expression des ARN codant les protéines de surface. Elle correspondrait à la diminution de deux fois de l'expression des ARN des protéines de surface observée 8 jours après infection par le virus HBV HBc-27* (Figure 45). Des études complémentaires de Run on ou d'ARN naissants permettront de déterminer si cette activité est transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle. De nombreuses données de la littérature suggèrent qu'HBc pourrait avoir un rôle sur la transcription. En effet elle est recrutée sur l'ADNccc et modifie sa structure (Bock et al., 2001). HBc est également capable de réguler la transcription des gènes cellulaires et il a été montré que la protéine est recrutée sur les ilots CpG de l'ADNccc et que cette association est corrélée avec un état actif de la chromatine (Guo et al., 2011).

5. Etude du rôle d'HBc sur la localisation de l'ADNccc dans le contexte de l'organisation 3D du génome.

Dans une étude récente visant à étudier la localisation de l'ADNccc dans le contexte de l'organisation tridimensionnelle du noyau, le laboratoire a montré que l'ADNccc n'est pas localisé au hasard dans le noyau. Pour cela nous avons appliqué la technique de Chromosome Conformation Capture (3C) qui permet la détection des contacts entre les régions d'un génome afin d'analyser l'organisation spatiale des chromosomes au sein d'un noyau. Cette technique a permis l'accès à un niveau d'information sur les structures topologiques présentes dans les chromosomes de mammifères, jusque-là invisibles par les techniques de microscopie et a permis notamment de mettre en évidence plusieurs niveaux d'organisation : des boucles chromatiniennes - contacts locaux entre régions régulatrices et gènes cibles - ainsi que des domaines, couramment appelés TAD (topologically associating domains) – qui sont des régions délimitées au sein desquelles il y a un enrichissement de contact par rapport au reste du chromosome. Les TAD sont eux-mêmes organisés

spatialement dans le noyau en deux compartiments distincts appelés A et B et qui correspondent respectivement à des régions riches en gènes et transcriptionnellement active ou plutôt des régions pauvres en gène et de type hétérochromatine. Il a été montré que certaines fonctions biologiques d'une cellule sont liées à l'organisation spatiale du génome de celle-ci. L'étude menée par le laboratoire a notamment permis de mettre en évidence que l'ADNccc contact préférentiellement la chromatine active (compartiment A) au niveau des ilots CpG et est déplété des régions réprimées contactant les lamines. Au cours de cette étude il a été recherché quel est le mécanisme responsable de l'adressage de l'ADNccc au niveau des ilots CpG. Le premier facteur étudié a été la protéine HBx car elle est impliquée dans la régulation transcriptionnelle de l'ADNccc et des gènes cellulaires. Les résultats ont montré que les virus déficients pour HBx montrent la même localisation nucléaire que le virus sauvage (Moreau et al., 2018). Le deuxième facteur viral à être présent sur l'ADNccc et également sur les gènes cellulaires est la protéine HBc. Elle est en particulier recrutée sur les îlots CpG de l'ADNccc et cela corrèle avec une réplication active du virus (Guo et al., 2011). Ayant observé une diminution de 2 fois dans la guantité des



Figure 46 : Contacts des virus HBV WT et HBV HBc-Flag avec le génome.

Des PHH ont été infectés par le virus HBV WT ou HBV HBc- à une MOI de 100 génomes équivalents par cellule. 10 jours après infections les noyaux des cellules ont été récupérés afin de générer des librairies de contacts génétiques (Hi-C). Après une étape de capture des séquences virales, les librairies ont été séquencées par séquençage à haut débit puis le nombre de contacts de l'ADNccc avec différents éléments biologiques ont été comparés avec les contacts d'un modèle aléatoire. ARN preS/S en absence d'HBc, nous nous sommes demandé si HBc pouvait participer au positionnement de l'ADNccc dans le noyau favorisant ainsi sa transcription.

Pour répondre à cette question, nous avons isolé les noyaux des cellules infectées par les virus HBV WT ou HBV HBc-27* 10 jours après infection puis préparé les librairies de contacts génomique (Hi-C) pour étudier les contacts entre le génome humain et l'ADNccc. Après avoir réalisé les librairies Hi-C, nous avons ajouté une étape de capture des séquences virales afin d'enrichir le nombre de contacts virus/génome humain. Afin de déterminer si HBV HBc-27* contacte les mêmes éléments biologiques que HBV WT, nous avons utilisé la même approche que celle décrite dans l'étude précédente qui consiste à étudier le nombre de contacts du virus avec un élément biologique donné comparé à un modèle aléatoire. Le modèle aléatoire des contacts a été réalisé en prenant aléatoirement le même nombre de contacts virus/génome humain/génome humain des librairies que le nombre de contacts humains dans chacun des éléments biologiques, puis ce tirage a été répété 100 fois.

Nous avons tout d'abord confirmé dans notre expérience que nous obtenons les mêmes contacts de l'ADNccc avec les éléments biologiques décrits précédemment pour le virus HBV WT. L'ADNccc du virus sauvage est exclu des régions réprimées contactant les lamines et est enrichi au niveau des CpGi (Figure 46 Gauche). Lorsque nous analysons les contacts du virus HBV HBc-27* avec le génome humain, nous observons que bien que le virus contacte encore les CpGi, il est retrouvé au niveau des lamines suggérant que ce virus perd en partie sa capacité à être exclu des zones réprimées pour contacter préférentiellement la chromatine active.

Ces résultats suggèrent que la protéine HBc joue un rôle dans l'adressage de l'ADNccc vers les zones actives de la chromatine. Il est possible que la localisation de l'ADNccc en dehors des éléments biologiques comme les CpGi puissent influer sur l'expression des gènes viraux.

L'étude du virus HBV HBc-27* a permis de mettre en évidence plusieurs effets. Tout d'abord, l'introduction de codons Stop ou la modification de la séquence du gène HBc semble modifier l'expression de l'ARNpg lorsque HBc est exprimée suggérant un effet post-transcriptionnel spécifique de la séquence nucléotidique. Ensuite lors de l'infection par le virus déficient pour l'expression d'HBc, le défaut d'expression de l'ARNpg est amplifié et les ARN codants pour les protéines de surface diminuent
également d'environ deux fois à jour 8 après l'infection indiquant qu'HBc pourrait jouer un rôle sur la biologie des ARN viraux. De façon intéressante l'expression des ARNpg n'est restaurée que partiellement (2 fois) par HBc confirmant que l'introduction de codon stop dans la région HBc pourrait avoir deux impacts : un impact sur la séquence de l'ARNpg modifiant sa stabilité et un deuxième impact lié à l'absence d'HBc qui jouerait un rôle sur l'activité transcriptionnel et/ou post-transcriptionnel des ARN viraux via un mécanisme qui reste à élucider. Ce défaut dans les ARN viraux est déjà observé dans le noyau des cellules, il semble donc que le défaut apparaisse avant le transport des ARN viraux. Des expériences préliminaires de chromosome conformation capture et de capture virale ont permis de montrer que la protéine HBc pourrait jouer un rôle dans la localisation nucléaire de l'ADNccc et pourrait via ce mécanisme moduler sa transcription.

C. Impact de la position du codon Stop d'HBc sur la stabilité de l'ARNpg

Nos expériences ont montré que l'introduction de deux codons stop dans la séquence d'HBc entraine une diminution de l'expression de l'ARNpg et ceci en présence d'HBc suggérant que le déplacement du codon stop peut jouer un rôle sur la stabilité. En effet, il existe au sein des cellules une voie de surveillance permettant de reconnaitre la présence d'un codon stop aberrant trop éloigné de l'extrémité 3' de l'ARN : la NMD (Nonsens Mediated Decay). C'est le cas pour les ARN viraux polycistroniques et non épissés qui ont des codons stops bien avant l'extrémité 3'. Les virus ont donc ont donc évolué et développé des stratégies pour échapper à cette surveillance cellulaire, comme cela a été montré pour le virus du Sarcome de Rous (RSV) qui possède un élément stabilisateur en aval du codon stop du gène gag (Balistreri et al., 2017; Barker and Beemon, 1994). Le codon stop naturel de la protéine HBc se trouve également bien avant l'extrémité 3' et il est possible que celui-ci soit protégé de la reconnaissance pour la voie NMD. Nous avons donc émis l'hypothèse que le déplacement du codon stop induit la reconnaissance et la dégradation de l'ARNpg par la voie NMD. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons modifié la nature et la position de ce codon stop afin de le rapprocher du codon naturel et voir si cela impactait la dégradation.

Résultats

Nous avons donc remplacé les deux codons par un seul codon stop au codon 27, afin de voir si la présence de deux codons stop en tandem pouvait amener à la reconnaissance et à la dégradation de l'ARNpg. Nous avons également conservé la même mutation, à savoir les deux codons stop, mais à différents endroits dans la séquence d'HBc en mutant les codons après les positions 38 et 67. Enfin, nous avons construit le vecteur pHBV1.3 WT/HBc, qui contient la séquence HBV WT dans le même vecteur que celui utilisé pour la production des virus mutés pour HBc afin de s'assurer que le défaut ne pouvait pas provenir de l'utilisation d'un vecteur différent.



Figure 47 : Impact de la présence d'un codon stop dans le gène HBc sur la stabilité de l'ARNpg.

Les cellules HepG2 ont été transfectées par les plasmides indiqués et les ARN viraux ont été extraits 3 jours après transfection et analysés par RT-qPCR avec des amorces spécifiques de l'ARNpg. Les barres d'erreur représentent la SEM de 3 expériences indépendantes *** P Value <0,0001 ** P Value < 0,001.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'effet de ces mutations lors de la transfection des plasmides dans des cellules HepG2 en quantifiant spécifiquement l'ARNpg par RT-qPCR (Figure 47). Nous avons observé que les ARN produits par le plasmide pHBV1.3WT/HBc, sont exprimés au même niveau que ceux produits par le plasmide payw1.2. Ces résultats indiquent que le vecteur utilisé pour l'expression des virus mutés pour HBc, n'influence pas l'expression des ARN viraux. La quantification de l'ARNpg transcrit à partir des génomes mutés après le codon 27 (1 ou 2 codons STOP) dans la séquence d'HBc, conduit à un même défaut d'expression de l'ARNpg suggérant que la présence de deux codons STOP n'explique pas la diminution de l'ARNpg. Enfin la transfection du plasmide contenant le génome HBV avec un codon

STOP positionné après le codon 38 présente le même défaut d'expression d'ARNpg que le génome viral possédant le codon stop après le codon 27 alors que le génome muté au codon 67 ne possède aucun défaut comparé aux virus sauvages (Figure 47).



Figure 48 : Prédiction des structures secondaires de l'ARNpg.

La structure secondaire des nucléotides 1-1000 des séquences théoriques de l'ARNpg de HBV WT, HBV HBc27*TAATAA, HBV HBc27*TAA, HBV HBc38*TAATAA et HBV HBc67*TAATAA ont été analysés par le logiciel Mfold. Les représentations montrent les structures prédictives avec le moins d'entropie.

L'introduction de codons STOP dans ces séquences peut avoir un impact sur la structure secondaire de l'ARNpg et sa stabilité. Nous avons donc étudié les prédictions de structure secondaire des 1000 premiers nucléotides pour l'ARNpg WT, I'ARNpg HBc27*TAATAA, I'ARNpg HBc27*TAA, I'ARNpg HBc38*TAATAA et I'ARNpg HBc67*TAATAA grâce au serveur Mfold. Les représentations graphiques de ces structures sont présentées dans la Figure 48. Nous avons tout d'abord vérifié que ces mutations n'affectaient pas la structure ε dont la tige boucle joue un rôle primordial pour la biologie de l'ARNpg. Dans tous les cas, lorsque l'on compare les structures prédites pour l'énergie minimale, nous retrouvons la présence de cette tige boucle pour tous les mutants (Figure 48, en rouge). Nous pouvons remarquer que les mutations au codon 27 semblent modifier la structure secondaire de l'ARNpg avec la disparition d'une tige boucle. Cependant cette modification de la structure secondaire ne permet pas d'expliquer la diminution des ARNpg. En effet le mutant HBc38*TAATAA qui a un défaut d'ARNpg comparable aux mutants à la position 27 ne semble pas avoir une structure secondaire différente de celle de l'ARNpg WT. La mutation au codon 67 elle ne semble pas induire de modifications majeures de la structure secondaire de l'ARNpg.

La nature de ces codons stop ou la structure secondaire ne semblent pas influencer le défaut d'expression des ARNpg. Il est donc probable que ce soit le positionnement du codon stop qui influence la stabilité de l'ARNpg.

Nous avons par la suite réalisé des infections avec les virus HBV HBc-27*, HBV HBc-38* ou HBV HBc-67* possédants 2 codons stops afin d'observer l'expression des



Figure 49 : Etude de la transcription virale après infection par les différents mutants déficients pour HBc.

Les cellules HepG2 NTCP ont été infectées à une MOI de 100 génomes équivalents par cellule par les virus HBV WT, HBV HBc-27*, HBV HBc-38* ou HBV HBc-67*. 10 jours après infection les ARN viraux totaux et l'ARNpg ont été quantifiés par RT-qPCR. Les barres d'erreurs représentent la SEM de deux expériences indépendantes.

ARN viraux lorsqu'ils sont transcrits à partir de l'ADNccc (Figure 49). 10 jours après infection nous observons un défaut d'expression des ARN totaux et d'ARNpg pour le mutant HBV HBc-27* comme observé précédemment. Le virus HBV HBc-38* montre le même défaut d'expression de l'ARNpg et des ARN totaux que le virus HBV HBc-27*. Les deux virus semblent donc être régulés de la même façon. Enfin, le virus HBV HBc-67*, qui ne montrait pas de défaut du niveau d'ARNpg lors de l'expérience de transfection du plasmide montre un défaut de transcription ou de stabilité des ARN viraux lorsqu'ils sont exprimés à partir de l'ADNccc et en absence d'HBc. Ces défauts sont cependant moins importants que pour les virus HBV HBc-27* et HBV HBc-38*.

Pour conclure nous avons mis en évidence que lors de la transfection des plasmides permettant l'expression des virus déficients pour HBc, et donc en présence d'HBc, nous observons un effet sur l'expression de l'ARNpg des virus ayant un codon stop après les codons 27 et 38 d'HBc suggérant que la présence du codon stop influence l'expression de cet ARN, vraisemblablement au niveau de sa stabilité. Dans le contexte de l'infection en revanche, le rôle d'HBc semble être plus complexe. En effet lors des infections et donc en absence d'HBc, nous voyons un impact plus important sur la diminution de l'ARNpg et l'apparition d'un défaut sur les ARN preS/S. Dans le cas de l'infection par HBV HBc-27* le défaut d'expression de l'ARNpg n'est qu'en partie restauré lorsque HBc est ré-exprimée. Ces résultats suggèrent que l'introduction de codons stop au niveau de la séquence codant HBc a deux impacts : un effet indépendant d'HBc sur la stabilité de l'ARNpg et un effet dépendant d'HBc sur l'expression des ARN viraux. Nous avions au préalable confirmé que la quantité d'ADNccc était semblable pour l'infection par le virus sauvage ou le virus HBV HBc-27*, et nous avons séquencé l'ADN RC présent dans les particules virales pour confirmer la présence des mutations et l'absence de recombinaison des génomes viraux. Enfin nous avons observé que l'ADNccc du VHB HBc-27* contacte différemment l'ADN cellulaire par rapport au virus sauvage et n'est plus exclu des régions réprimées contactant les lamines, un mécanisme pouvant participer à la diminution de la transcription de l'ADNccc.

Afin de comprendre les mécanismes mis en jeu par la protéine HBc dans le cadre de cette régulation nucléaire, la deuxième partie de mon projet a été d'identifier les partenaires nucléaires d'HBc et d'étudier les propriétés de ces interactions.

Résultats

Partie II - Purification et étude des partenaires nucléaires d'HBc

A. Contexte

Par l'étude des mutants déficients pour HBc, nous avons pu mettre en évidence que la protéine provenant de la capside lors de l'infection était recrutée sur l'ADNccc après être déstabilisée dans le pore nucléaire. La protéine HBc est donc présente sur l'ADNccc lors de nos infections, et bien qu'elle semble diminuer à 10 jours après infection, il est tout à fait possible que la protéine puisse réguler l'expression de l'ADNccc dans ce contexte. Nous avons également émis l'hypothèse qu'HBc pourrait agir sur l'expression des ARN dans le noyau et notamment pourrait influencer la stabilité des ARN viraux. En effet, les défauts d'expression des ARN viraux sont exacerbés en absence d'HBc. Ce défaut observé apparaît très tôt après la transcription des ARN viraux, et la différence entre les deux virus est significativement différente dès deux heures après la transcription, ce qui nous laisse penser qu'il s'agit d'un mécanisme nucléaire.

Afin de comprendre les mécanismes qui permettent à HBc de réguler ces événements, nous avons identifié les partenaires nucléaires d'HBc par spectrométrie de masse et étudié le rôle de certains d'entre eux. Pour cela nous avons établi deux lignées de cellules HeLaS3 exprimant stablement la protéine HBc ou un mutant d'HBc possédant une substitution de la tyrosine 132 en alanine (HBcY132A). Ce mutant garde sa capacité à former des dimères mais perd celle d'autoassemblage. La conformation d'HBc sur l'ADNccc n'est pas connu c'est pourquoi nous avons également identifié les partenaires d'HBc sous la forme de dimère. Puis nous avons confirmé l'interaction avec ces partenaires, et analysé leurs rôles sur l'infection virale. Cette étude du rôle des partenaires sur l'infection virale a été réalisée avec le mutant HBV HBc-Flag27*, et il sera nécessaire de les répéter avec les autres mutants déficients pour HBc.

B. Isolation des partenaires nucléaires d'HBc.

Nous avons établi les lignées HelaS3 exprimant la protéine HBc ou le mutant HBcY132A avec une étiquette HA-Flag en N-ter (HeLaS3-HF-HBc et HeLaS3-HF-HBcY132A) par transduction et sélection grâce à un vecteur rétroviral exprimant également la chaine α du récepteur à l'interleukine-2 (IL2R α) permettant la sélection des cellules transduites. Nous avons tout d'abord vérifié l'expression des protéines par western blot et par immunofluorescence (Figure 50A et B). Nous avons également

confirmé par western blot natif que le mutant HBcY132A n'était pas capable de former des capsides. Des capsides natives sont observées par western blot natif dans les extraits correspondant aux cellules exprimant la protéine sauvage mais pas dans ceux exprimant le mutant HBcY132A (Figure 50A panneau du bas).



Figure 50 : Vérification de l'expression de la protéine HBc dans les lignées transduites.

Les lignées HelaS3 ont été transduites par un vecteur contrôle, un vecteur exprimant HBc WT-HA-Flag ou HBcY132A-HA-Flag. **A)** Vérification de l'expression d'HBc par western blot dénaturant ou de la présence des capsides par western blot natif. **B)** Contrôle de l'expression d'HBc par immunofluorescence. Vert : HBc ; Rouge : Tag HA : Bleu : DAPI.

Nous avons isolé les noyaux pour ces deux lignées ainsi que pour la lignée HelaS3-HF-Mock qui servira de contrôle négatif. Nous avons tout d'abord contrôlé l'efficacité du fractionnement nucléo-cytoplasmique afin de purifier des partenaires strictement nucléaires (Figure 51A) puis nous avons procédé à la purification des partenaires d'HBc par affinité en tandem (TAP-TAG) grâce aux épitopes Flag puis HA. Les résultats de ces purifications ont été observé par coloration à l'argent (Figure 51B) puis analysés par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

Lors de cette analyse nous avons pu identifier des partenaires principalement enrichis dans la fixation à l'ARN, au promoteur, mais aussi des protéines de fixation à l'ADN et des facteurs de transcription. Nous avons également trouvé beaucoup de protéines impliquées dans les voies de réparation des dommages à l'ADN. Nous n'avons identifié parmi ces protéines que 5 protéines interagissant à la fois avec la protéine HBc et avec le mutant Y132A incapable de faire les capsides (Figure 51C). Nous avons également remarqué que l'analyse des partenaires de la protéine sauvage donne beaucoup moins de candidats. Cela peut s'expliquer par la formation des capsides dans ces extraits et donc la perte de certains sites d'interaction avec d'autres partenaires. Nous pouvons noter que parmi ces partenaires communs aux deux analyses nous retrouvons la nucléophosmine B23, qui est un partenaire précédemment décrit ce qui valide notre analyse (Jeong et al., 2014; Lee et al., 2009).



Figure 51 : Identification des partenaires nucléaires d'HBc par spectrométrie de masse

A) Les cellules HelaS2 Mock sont utilisées comme contrôle, les cellules HelaS3 HF-HBc et HelaS3 HF-HBcY132A expriment respectivement la protéines HBc sauvage ou mutée HBcY132A avec des étiquettes Flag et HA. Afin d'obtenir les partenaires nucléaires les noyaux ont été isolés par fractionnement mécanique. L'efficacité de ce fractionnement a été analysé par western blot avec des anticorps dirigés contre la lamineB1 et contre HBc (N : noyaux ; C : cytoplasme). *B*) Après lyse des noyaux, les partenaires d'HBc WT ou HBcY132A ont été isolés par immunoprécipitations successive Flag puis HA. La purification des partenaires d'HBc a été contrôlée par dépôt des extraits coloration au gel d'argent. 1 : HelaS3-HF-mock - 2 : HelaS3-HF-HBc – 3 : HelaS3-HF-HBcY132A. Les partenaires ont ensuite été identifiés par spectrométrie de masse et les résultats ont été analysés par rapport à l'analyse des peptides présents dans la condition Mock. *C)* Diagramme de Venn des partenaires purifiés avec les protéines HBC et/ou HBcY132A. *D*) Analyse par GeneOntology des fonctions moléculaire des partenaires purifiés avec HBcY132A.

Nous avons donc cherché à confirmé l'interaction de certains de ces partenaires et analysé leurs rôles sur la réplication virale.

C. Interaction avec la protéine SRSF1.

Un des partenaires identifié dans cette analyse est la protéine SRSF1 (Serine Rich Splicing Factor 1). Cette protéine de la famille des SR protéines est impliquée

dans l'épissage des ARN, mais également dans l'export des ARN correctement épissés en interagissant avec NFX1. La protéine peut également diriger les ARN aberrants vers des voies spécifiques de dégradation des ARN non-sens décrite précédemment (Sato et al., 2008). Nous n'avons pas encore pu confirmer l'interaction de la protéine avec HBc. En revanche, il semblerait que d'autres équipes de recherche aient également retrouvé ce facteur, ainsi que de nombreuses autres protéines de la famille de SR protéines dans leurs analyses de partenaires d'HBc (Résultats non publiés). Etant donné son rôle dans les voies de surveillance des ARN, et le défaut observé avec les mutants HBV déficient pour HBc, nous avons cherché à savoir si la protéine pouvait être impliquée dans la biologie des ARN viraux, notamment au niveau de l'épissage, de l'export ou de la stabilité.





Les cellules hepG2 NTCP ont été infectées à une MOI de 100 génomes équivalents par cellule par le virus HBV WT ou le virus HBV HBc-Flag27*. 24h puis 48h après infection les cellules ont été traitées par des siARN dirigés contre SRSF1. 8 jours après infection les ARN ont été extraits et l'expression de SRSF1 et des ARN viraux ont été analysés par RT-qPCR. Les barres d'erreurs représentent la SEM de 4 expériences indépendantes. * P value <0,05

Nous avons donc éteint l'expression de la protéine par siARN lors d'infections par le virus HBV WT ou HBV HBc-Flag27*. Nous observons une efficacité d'extinction d'environ 80% de l'expression de la protéine (Figure 52A). Dans les deux cas nous observons une augmentation de la quantité des ARN viraux pouvant indiquer que la protéine peut jouer un rôle sur la régulation de l'ADNccc ou encore sur la dégradation des ARN viraux. Cette augmentation est d'un facteur 1,5 dans le cas de l'infection par le virus sauvage et de 3,5 fois lors de l'infection par le virus déficient pour HBc indiquant que SRSF1 pourrait être en partie responsable de la diminution de la quantité des ARN viraux en absence d'HBc, et qu'HBc pourrait contrecarrer cet effet. Nous

sommes actuellement en cours d'investigation sur le rôle de SRSF1, notamment son recrutement sur les ARN viraux par des expériences d'immunoprécipitation d'ARN (R-IP).

D. Interaction avec le complexe FACT

Parmi les protéines interagissant avec la protéine HBcY132A, nous avons également obtenu les protéines SPT16h et SSRP1 qui sont les deux composants du complexe FACT (FACT : *Facilitates Chromatine Transcription*). Cet hétérodimère permet d'augmenter l'efficacité d'élongation de la transcription en facilitant le passage de l'ARN Polymérase sur l'ADN lorsqu'il est chromatinisé, comme c'est le cas pour l'ADNccc. Le complexe possède une affinité pour les dimères d'histones H2A/H2B et joue le rôle de chaperonne pour les nucléosomes. Il induit notamment la déstabilisation de nucléosomes afin de diminuer les contraintes topologiques appliquées lors du passage de l'ARN Pol II puis la re-déposition des nucléosomes après le passage de l'ADN polymérase. Le complexe joue également un rôle dans la réparation des dommages à l'ADN en recrutant le variant d'histone H2AX sur l'ADN (Heo et al., 2008).

Nous avons tout d'abord confirmé l'interaction d'HBc avec les deux protéines du complexe dans les cellules HelaS3-FH-HBcY132A par co-immunoprécipitation (Figure 53A). Nous avons également voulu confirmer cette interaction dans un contexte se rapprochant plus des conditions infectieuses. Pour cela nous avons utilisé la lignée HepaD38, qui exprime stablement 1,2 copies du génome du VHB et exprime donc toutes les protéines virales. Par immunoprécipitation de la protéine HBc dans





A) Le lysat de cellules HelaS3 HF-HBcY132A a été immunoprécipité avec des anticorps α-HA. Les extraits ont ensuite été analysés par western blot avec des anticorps spécifiques de la protéine HBc, de SSRP1 ou de SPT16.
B) Les cellules HepaD38 possèdent 1,3 copies intégrées du génome viral et expriment toutes les protéines virales. La protéine HBc a été immunoprécipitée dans des extraits d'HepaD38 grâce à un anticorps spécifique pour HBc. Les extraits ont ensuite été analysés par western blot avec des anticorps spécifiques de la protéine HBc, de SSRP1 ou de SPT16.

des lysats d'HepaD38 nous pouvons observer la co-immunoprécipitation des deux protéines du complexe (Figure 53B).

Nous avons ensuite utilisé une approche d'extinction de gène par siARN afin d'étudier le rôle du complexe sur le cycle viral. Nous avons utilisé des siARN ciblant la protéine SSRP1. Les analyses par western blot et par RT-qPCR montrent une diminution de l'expression de l'ARN et de la protéine SSRP1, mais également de la protéine SPT16 dans les cellules transfectées par le siARN dirigés contre SSRP1 (Figure 54A et B). Lors d'une infection par le virus HBV WT ou par le virus HBV HBcFlag27*, nous pouvons observer que la transcription du virus HBV WT est augmentée significativement de 2 fois en absence du complexe alors que la transcription du virus déficient pour HBc est inchangée indiquant que le complexe pourrait jouer un rôle sur la régulation de la transcription virale, en présence d'HBc (Figure 54C).





Les cellules HepG2-NTCP ont été infectées par HBV WT ou HBV HBc-Flag27* à une MOI de 100génomes équivalents par cellule. 24h et 48h après infection, les cellules ont été transfectées avec des siARN ciblant SSRP1. 8 jours après infection les cellules ont été récoltées. Les ARN totaux et les lysats cellulaires ont été extraits. A) vérification de l'extinction de SSRP1 et SPT16 par western blot **B**) vérification de l'extinction de SSRP1 par RT-qPCR **C**) analyse de l'expression des gènes viraux par RT-qPCR.

Afin de confirmer un rôle direct du complexe FACT sur l'ADNccc, nous avons analysé le recrutement de la protéine SPT16h sur l'ADNccc par ChIP à 3 puis 10 jours après infection avec du virus HBV WT et du virus HBV HBc-Flag. Cette expérience n'a pu être réalisée qu'une seule fois mais les résultats préliminaires semblent indiquer que la protéine SPT16h n'est pas présente à des temps courts après infections pour aucune des souches virales, mais est recrutée sur l'ADNccc du virus HBV WT à des temps plus tardifs (ici 10 jours après infection). La protéine n'est en revanche pas recrutée sur l'ADNccc du virus HBV HBc-Flag27* (Figure 55).



Figure 55 : Etude du recrutement de la protéine SPT16 sur l'ADNccc

Les cellules HepG2 NTCP ont été infectées à MOI de 500 génomes équivalents par cellule. 8 jours après infections les cellules ont été récupérées et le recrutement de SPT16 sur l'ADNccc a été analysées par ChIP-qPCR avec des amorces spécifiques de l'ADNccc

Ces résultats semblent indiquer que le complexe FACT joue un rôle sur la transcription du VHB et que son recrutement sur l'ADNccc pourrait se faire par le biais d'HBc. Cependant, ces résultats n'expliquent pas l'absence de transcription ou de stabilité des ARN viraux lorsque le virus est déficient pour HBc. Nous nous sommes donc également intéressés aux autres partenaires.

E. Interaction de la protéine HBc avec les protéines histones.

Lors de l'analyse des partenaires obtenus nous avons également identifié de nombreuses protéines de la famille des protéines histones. La protéine HBc est présent sur l'ADNccc et induit une réduction de l'espacement entre les nucléosomes (Bock et al., 2001). Cependant la façon dont elle est recrutée sur le minichromosome n'est pas connue. Une interaction directe avec les protéines histones serait une piste potentielle. De plus les protéines histones H2AX et H4 ont été retrouvées dans les analyses de spectrométrie de masse des deux variants de la protéine HBc ce qui indique qu'ils puissent être des partenaires tangibles. Le linker histone H1.3 a lui été trouvé seulement dans les partenaires de la protéines HBcY132A. Et l'histone H2B a été retrouvée dans les analyses des partenaires de la protéine sauvage.

Nous avons donc voulu confirmer ces interactions par immunoprécipitation dans les cellules HelaS3-HF-HBcY132A. Nous avons pu confirmer l'interaction d'HBc sous ses deux formes avec l'Histone H2B (Figure 56B) et également l'interaction des Histones H1 et H2AX avec la protéine HBcY132A (Figure 56A et C). L'interaction avec l'histone H4 n'a pas encore pu être mise en évidence.



Figure 56 : Interaction d'HBc avec les protéines Histones.

Les lysats de cellules HelaS3-HF-HBc ou HelaS3 HF HBcY132A ont été immunoprécipités avec des anticorps α-HA puis déposés sur un gel et révélés avec des anticorps spécifiques pour HBc, Histone H1, Histone H2B et Histone H2AX.

De façon intéressante le variant de H2AX est impliqué dans les mécanismes de réparation des dommages doubles brins sur l'ADN et son apposition sur l'ADN est réalisée en partie par le complexe FACT. Les travaux tendent à montrer que cette voie jouerait un rôle proviral dans le contexte de l'infection par le VHB (Gómez-Moreno and Garaigorta, 2017; Schreiner and Nassal, 2017; Sheraz et al., 2019). Il serait intéressant d'évaluer le recrutement de ce variant d'histone sur l'ADNccc, lors d'une infection par HBV WT ou déficient pour HBc, mais également lors de l'extinction du complexe FACT.

F. Interaction avec USP3

Nous nous sommes également intéressés à l'interaction entre HBc et la protéine USP3. Cette protéine est une hydrolase qui est impliquée dans la dé-ubiquitination des histones H2A et H2B, notamment lors des phénomènes réponses aux dommages à l'ADN.



Figure 57 : Interaction d'HBcY132A avec USP3.

Les lysats de cellules HelaS3 HF-HBc et HelaS3 HF-HBcY132A ont été immunoprécipités avec des anticorps α-HA puis déposés analysés par western blot avec des anticorps spécifiques pour HBc et USP3.

Nous avons pu mettre en évidence une interaction entre HBc sous ses deux formes et USP3 par co-immunoprécipitation dans les cellules HelaS3 (Figure 57). Des études sont en cours afin de caractériser le rôle de cette interaction.

G. Interaction avec les protéines des voies de réparation de dommages à l'ADN

Les résultats précédents indiquent que la protéine HBc pourrait interagir avec des facteurs impliqués dans la voie de réparation des dommages à l'ADN comme H2AX, le complexe FACT et la protéine USP3. Nous nous sommes donc intéressés plus particulièrement aux partenaires obtenus impliqués dans cette voie. Comme évoqué précédemment il a été montré que cette voie jouait un rôle sur la réplication virale. Les travaux ont notamment montré que les Topoisomérases I et II sont impliqués dans la formation de l'ADNccc (Sheraz et al., 2019). Ces protéines contrôlent la topologie de l'ADN en induisant des coupures et des ligations des brins. Ainsi, en plus de leurs rôles dans la réparation des dommages à l'ADN, ces topoisomérases peuvent être impliquées dans la régulation transcriptionnelle en réduisant les contraintes topologiques.

Nous recherché si, par le biais de la protéine HBc, les topoisomérases I et IIβ (Topol et TopolIβ) pouvaient réguler la transcription virale. Nous avons tout d'abord confirmé l'interaction des deux protéines avec la protéine HBcY132A par coimmunoprécipitaion dans les cellules HelaS3 HF-HBcY132A (Figure 58A et D). Afin de comprendre l'implication de ces protéines sur la réplication virale et le lien avec la protéine HBc, nous avons éteint l'expression de ces deux partenaires lors des infections HBV WT et HBV HBc-Flag27^{*}. Ces expériences n'ont pu être réalisées



Figure 58 : interaction d'HBc avec les topoisomérases I et IIß

A, **D**) Les lysats de cellules HelaS3 HF HBcY132A ont été immunoprécipités avec des anticorps α-HA puis analysés par western blot avec des anticorps spécifiques pour HBc, Topol et TopolIβ. **B-C**) Les cellules HepG2 NTCP ont été infectées à une MOI de 100génomes équivalent/cellule par les virus HBV WT ou HBV HBc-. 24h après infection, les cellules ont été transduites par des lentivecteurs exprimant un sh non spécifique ou un sh dirigé contre Topol. 8 jours après infection les ARN ont été extraits et l'expression de Topol et des ARN viraux a été analysée par RT-qPCR. **E-F**) Les cellules HepG2 NTCP ont été infectées à une MOI de 100génomes équivalent/cellule par les virus HBV WT ou HBV HBc-. 24 après infection, les cellules ont été transduites par des lentivecteurs exprimant un sh non spécifique ou un sh dirigé contre Topol. 8 jours après infection les ARN ont été extraits et l'expression de Topol et des ARN viraux a été analysée par RT-qPCR. **E-F**) Les cellules HepG2 NTCP ont été infectées à une MOI de 100génomes équivalent/cellule par les virus HBV WT ou HBV HBc-. 24 après infection, les cellules ont été transduites par des lentivecteurs exprimant un sh non spécifique ou un sh dirigé contre TopolIβ. 8 jours après infection les ARN ont été extraits et l'expression de TopolIβ et des ARN viraux a été analysée par RT-qPCR.

qu'une seule fois, mais il semble que la protéine Topol, dont l'extinction atteint environ 50% n'ait pas d'impact sur la réplication virale (Figure 58 B et C). Il est également possible que l'extinction ne soit pas suffisante. Lorsque l'expression de Topollβ est éteinte en revanche nous pouvons observer une forte diminution de l'expression des ARN viraux dans les infections par les deux souches virales et d'un facteur 3 pour les deux virus (Figure 58E et F). Comme montré dans les travaux d'autres équipes, Topollβ semble donc être impliqué dans la réplication virale. Cela semble indépendant de l'expression d'HBc car les deux virus sont impactés de la même façon. Cependant nous avons observé précédemment que la protéine HBc provenant avec la capside est présente sur l'ADNccc, et pourrait donc permettre le recrutement de Topollβ de façon très précoce.

De façon très intéressante, nous avons donc observé que la protéine HBc interagit avec de nombreux partenaires impliqués dans les voies de réparation des dommages à l'ADN, comme le complexe FACT, l'histone H2AX et également les topoisomérases Topol et Topollβ. Ce dernier partenaire a déjà été montré comme jouant un rôle sur la formation de l'ADNccc. La protéine HBc, amenée avec la capside, pourrait être impliquée dans l'étape de formation de l'ADNccc en recrutant ces différents partenaires. Nous avons également pu mettre en évidence l'implication de la protéine SRSF1 sur la quantité des ARN viraux dans le cadre de l'infection déficiente pour HBc. L'inhibition de cette protéine permet de rétablir en partie la quantité d'ARN viraux laissant penser qu'elle est en partie responsable de l'instabilité des ARN viraux en absence d'HBc.

Discussion

Lors de cette étude, nous nous sommes intéressé au rôle nucléaire de la protéine HBc. En effet cette protéine possède une localisation nucléaire lorsque le virus se réplique à haut niveau, et elle est recrutée sur l'ADNccc et modifie la structure du minichromosome (Bock et al., 2001; Chu et al., 1997; Liao and Ou, 1995). Les données de la littérature indiquent que la protéine est recrutée sur les gènes viraux et cellulaires et module leur expression (Guo et al., 2012; Kwon and Rho, 2002; Xiang et al., 2015). Afin de mieux comprendre le rôle d'HBc dans ce contexte, nous avons construit plusieurs mutants déficients pour la protéine HBc en insérant des codons stop prématurément dans le gène d'HBc et étudié la réplication de ces virus. Nous avons également identifié un certain nombre de partenaires protéiques nucléaires d'HBc.

HBV HBc-Flag27* : répercussions de la mutation sur la biologie des ARN viraux.

Nous avons construit un mutant HBV HBc-Flag27* qui possède dans sa séquence génétique une substitution d'une partie du gène codant pour HBc par des épitopes, dont l'épitope Flag, et un codon stop a été inséré en amont de cette séquence étrangère. Nous avons observé que lors de la transfection de ce plasmide, et donc lorsque HBc est exprimé sous le contrôle du promoteur SV40, les ARN viraux sont correctement exprimés (Figure 32B et C). En revanche, dans le cadre de l'infection par ce virus, nous observons une forte diminution de l'expression de tous les ARN viraux (Figure 36). Cette modification de la séquence codante du gène core dans le contexte de la transfection du plasmide prHBV1.3HBc-Flag/HBc ne semble donc pas avoir d'impact sur l'expression des ARN viraux, alors que dans le contexte de l'expression des gènes à partir de l'ADNccc et en absence d'HBc, nous observons une forte diminution de l'expression des ARN viraux. Les expériences de quantification des ARN naissant lors des infections par HBV HBc-Flag27* nous laissent penser le défaut serait post transcriptionnel car il n'est pas visible lorsque l'on quantifie les ARN transcrit pendant 1h, mais est significativement visible après 2h (Figure 38). Nous devrons réaliser plus d'expériences afin de confirmer que ce défaut est bien un défaut de stabilité des ARN viraux, en quantifiant par exemple les ARN naissant avec un pulse d'EU plus courts afin de voir si nous pouvons observer le défaut ou en utilisant des inhibiteurs comme l'actinomycine afin de quantifier la demi-vie des ARN viraux.

Dans un premier temps, nous avons formulé l'hypothèse que la protéine HBc serait responsable de ce défaut. Cependant, nous ne sommes pas parvenus à rétablir l'expression des ARN viraux lors de l'infection par transduction de la protéine HBc (Figure 40). Il est difficile de conclure formellement qu'HBc n'est pas impliquée dans la diminution de l'expression des ARN viraux car le niveau d'expression d'HBc dans les expériences de transcomplémentation est bien au-delà des niveaux physiologiques. On peut ainsi imaginer que l'on peut bloquer par exemple la formation de dimères d'HBc nucléaires.

Si la protéine HBc n'est pas impliquée dans ce défaut d'expression, une autre hypothèse expliquant la différence d'expression des ARN viraux dans le cadre de la transfection et de l'infection serait la différence de matrice à l'origine des transcrits. En effet les ARN viraux ne sont pas exprimés à partir de la même matrice ADN. Lors de



prHBV1.3 HBc-Flag /HBc

Figure 59 : Parallèle entre le plasmide prHBV1.3 HBc-Flag27*/HBc et l'ADN RC HBV HBc-Flag27*.

Le plasmide prHBV1.3HBc-Flag27*/HBc permet l'expression d'un ARNpg à partir d'un génome linéaire et possède donc pour cela une répétition d'un tiers du génome, contenant les signaux de maturation des ARN : le signal de polyA et le PRE. Ces signaux sont éloignés de la mutation introduite. Lors de la formation de l'ADN RC, le génome est circularisé, cet évènement rapproche les signaux de maturation des ARN de la séquence mutée, pouvant influencer leur fonctionnement. la transfection ils sont exprimés à partir du plasmide, alors que lors de l'infection, ils sont transcrits à partir de l'ADNccc. Il est possible que la substitution présente dans la séquence codante d'HBc qui puisse nuire au fonctionnement des signaux présents à l'extrémité 3' des ARN viraux seulement quand ils sont exprimés à partir de l'ADNccc. En effet, le plasmide exprime un génome viral linéaire avec une répétition d'environ un tiers du génome, ceci afin de produire un ARNpg qui va être encapsidé et rétrotranscrit. Cette répétition terminale contient les signaux 3' qui vont réguler la maturation des ARN : le PRE ainsi que le signal de polyadénylation du génome (Figure 59, panneau du haut). Dans le contexte de l'expression à partir de l'ADNccc, les séquences régulatrices de la maturation des ARN se retrouvent à proximité des séquences modifiées ce qui pourrait perturber leur fonctionnement (Figure 59 panneau du bas). La séquence PRE se trouve entre les nucléotides 1151 et 1684 (Donello et al., 1996; Huang and Liang, 1993; Huang and Yen, 1994) et aucune séquence régulant la stabilité des ARN viraux n'a été décrite plus loin dans le génome. Le signal de polyadénylation est constitué de l'hexamère TATAAA à la position 1916 du génome viral avec un clivage environ 12-19 nucléotides après ce site, soit 60 nucléotides avant la mutation insérée (Perfumo et al., 1992; Simonsen and Levinson, 1983). Il a été montré que la polyadénylation régulait la stabilité des ARN viraux, et que la diminution de la taille de la queue polyA induisait la dégradation des ARN (Wu and Brewer, 2012). Pour le VHB, ce signal est légèrement différent de la séquence consensus de polyadénylation AATAAA et donc est moins efficace (Levitt et al., 1989). Pour l'hepadnavirus GSHV infectant les écureuils, il a été montré qu'une séquence de 397nt présente en amont du signal de polyadénylation régulait ce signal. Ce domaine enhancer de polyadénylation peut être divisé en trois sous-domaines. Une diminution de la polyadénylation est observée en l'absence d'un des domaines et lorsqu'ils ne sont pas exprimé le signal de polyA n'est pas pris en compte. Deux de ces domaines enhancers de polyadénylation se trouve en amont du promoteur précore, et donc lors de la transcription de l'ARNpg, l'ARN polymérase ne rencontrera qu'un seul des domaines et ne prendra pas en compte le signal de polyadénylation au premier passage. En revanche lorsque la polymérase arrive de nouveau dans cette région, les trois signaux sont lus et le signal de polyadénylation est utilisé pour la terminaison et la maturation des ARN viraux dont l'ARNpg (Russnak and Ganem, 1990). Ces séquences sont donc connues pour réguler les étapes de maturation des ARN, mais se trouvent en amont du signal de polyadénylation. La substitution insérée dans le gène HBc se trouve 60 nucléotides après ce signal polyA et environ 40 nucléotides après le site de clivage du polyA ce qui suggèrerait qu'elle ne perturbe pas ce mécanisme (Perri and Ganem, 1997). Cependant, l'étape de polyadénylation des ARN nécessite également une région en aval du site de clivage composé de séquences riches en nucléotides U et/ou en GU (Zarudnaya et al., 2003). Cette séquence est une séquence non conservée mais présente dans la majorité des gènes cellulaires, qui permet de recruter le facteur de polyadénylation CstF (Cliavge stimulation factor) et se trouve en général dans les 30 paires de bases suivant le clivage, mais peut se retrouver plus loin dans la séquence (Takagaki and Manley, 1997). Il a été montré que lorsque le signal de polyadénylation ne correspondait pas à la séquence consensus AATAAA, comme c'est le cas pour le VHB, cette région en 3' était extrêmement importante pour que le signal soit reconnu. Pour ces signaux dégénérés, les mutations de l'hexamère ne modifient que peu l'efficacité de polyadénylation, en revanche les mutations de la séquence riche en U ou G/U en aval va fortement diminuer l'efficacité de polyadénylation (Nunes et al., 2010). Pour le VHB, il a également été montré que la séquence présente en 3' du signal est importante et concerne les 30 nucléotides qui suivent le signal TATAAA (Simonsen and Levinson, 1983). Bien que la séquence modifiée dans la construction soit située à 60 nucléotides du signal polyA il sera intéressant d'étudier son rôle dans la régulation de la maturation des ARN viraux. Nous pourrons, pour ces études, utiliser le vecteur prHBV1.3WT/HBc dans lequel nous introduirons des mutations de cette région. En effet même si la mutation introduite régule les étapes de maturation des ARN viraux, ce vecteur permettra l'expression d'un ARNpg stable et correctement polyadénylé.

HBV et protection contre la voie de dégradation des ARN nonsens : étude de la position du codon stop dans la séquence d'HBc.

La modification de la séquence nucléotidique au niveau de la région core pouvant entrainer des modifications de l'expression des ARN viraux indépendamment de l'absence de la protéine HBc, nous avons construit un mutant qui possède deux codons stops après le codon 27 dans la séquence d'HBc sauvage, ce qui correspond à une substitution de 4 nucléotides sur tout le génome. Lors de la transfection de ce plasmide, nous observons un défaut du niveau d'expression de l'ARNpg d'environ 3 fois (Figure 41B et C). La présence de cette mutation ponctuelle des codons 28 et 29 semble donc induire une déstabilisation de l'ARNpg, indépendamment d'HBc. Ce résultat est confirmé dans le contexte de l'infection. En effet lors des infections par le virus HBV HBc-27* nous avons observé une très forte diminution de l'ARNpg, bien plus forte que lors de la transfection, avec également une diminution d'un facteur 2 à jour 8 après l'infection de l'expression des ARN codant les protéines de surface (Figure 42E). Ce défaut n'est que partiellement restauré lorsque la protéine HBc est amenée en trans par un vecteur lentiviral (Figure 45).

Nous observons une donc une diminution de l'ARNpg, ceci de façon indépendante de l'expression d'HBc, indiquant que cette mutation à elle seule à un impact sur la biologie des ARN viraux. Afin de comprendre l'origine de ce défaut, nous avons modifié la nature et la position du codon stop et observé que la présence d'un seul codon stop (substitution de 2 nucléotides) induisait le même défaut, de même que la présence de deux codons stops après le codon 38 du gène d'HBc. En revanche un codon stop après le codon 67 n'as pas d'effet sur l'expression des gènes viraux lors de la transfection du génome (Figure 60). Il semble donc que la position du codon stop dans la séquence d'HBc ait un impact sur la biologie de l'ARNpg. Cet ARNpg est un ARN non épissé et polycistronique qui permet l'expression d'HBc mais également de la polymérase. Il a été montré que la présence de plusieurs cadres de lecture, ainsi que l'absence d'épissage d'un ARN peut diriger ces ARN vers la voie de dégradation des ARN non-sens ou NMD (Nonsense Mediated Decay). En effet ces deux mécanismes vont induire la présence d'une queue d'ARN 3' libre qui va être reconnue par les effecteurs de la voie. Les protéines centrales effectrices de cette voie sont l'hélicase UPF1 (Up-frameshift suppressor 1), et les protéines UPF2 et UPF3 qui peuvent être recrutées sur les ARN possédant un codon stop prématuré dans un exon (plus de mécanismes sur la voie NMD dans la revue : Maquat, 2004). Les virus possédant des ARN polycistronique non épissés ont donc développé des stratégies qui vont permettre de ne pas être reconnue par cette voie. Une revue a récemment décrit les mécanismes d'échappement à la NMD pour les différents virus (Balistreri et al., 2017). Le virus du Sarcome de Rous (RSV), un alpharétrovirus, possède un mécanisme d'échappement similaire à ce que nous observons. Ce virus produit un ARN polycistronique non épissé qui code pour les gènes gag et pol. Le gène gag est



Figure 60 : Modèle de déstabilisation de l'ARNpg par l'introduction de codons stops.

le premier gène présent à l'extrémité 5' de l'ARN viral. Les travaux ont montré que lorsque le codon stop du gène gag est placé en amont du codon naturel, l'ARN était dégradé par la voie de la NMD. De plus, ils ont montré que plus le codon stop est placé proche du codon naturel de gag, moins les ARN sont sensibles à la NDM (Barker and Beemon, 1991, 1994). Nous pouvons donc faire le parallèle avec la dégradation de l'ARNpg lorsque la mutation se trouve au codon 27 et 38 du gène HBc mais pas au codon 67, plus proche du codon naturel (Figure 47). Enfin, ce défaut est exacerbé en absence de la protéine Gag, ce qui nous permet de faire un nouveau parallèle avec nos résultats qui montre une expression bien plus faible des ARN en absence d'HBc (Barker and Beemon, 1991). Il a été mis en évidence par la suite que les 397 nucléotides qui suivent le codon stop de gag agissent comme un élément stabiliseur des ARN appelé RSE (RNA stability element). Cet élément est une séquence riche en pyrimidine et va permettre le recrutement de la protéine PTB, qui inhibe le recrutement de la protéine UPF1 sur l'ARN viral (Ge et al.; Sawicka et al., 2008). De façon intéressante comme décrit précédemment, il a été montré que PTB joue un rôle sur l'export des ARN du VHB en se fixant sur le PRE (Zang et al., 2001). La protéine pourrait également jouer un rôle dans la stabilité de l'ARNpg. En 2016, Qi et al. ont étudié l'infection par un virus HBV déficient pour HBc avec un codon stop à la position 38, et n'ont pas observé de défaut dans la réplication (Qi et al., 2016). Cependant la réplication de ce virus est quantifiée par la production de l'antigène HBs dans le surnageant, et les guantifications de l'ARNpg n'ont pas été présentées. Nous sommes actuellement en cours d'étude du rôle de la NMD sur la stabilité des ARN viraux afin de voir si le VHB a pu développer une telle stratégie d'échappement à la NMD. Il sera intéressant de voir si l'extinction de UPF1 induira la stabilisation de l'ARNpg des virus HBV HBc-27* et HBV HBc-38*.

Toutefois, nous avons montré lors de l'infection que le défaut est déjà présent dans le noyau. La voie NMD dépend de la traduction et est donc cytoplasmique. Il semble que les ARN ciblés par la NMD soient reconnus lors de la primo-traduction de l'ARN quand les ARN viennent d'être relâchés du noyau ou bien lorsqu'ils se trouvent toujours au niveau du pore nucléaire avant la délivrance dans le cytoplasme et le fait que cet évènement ait lieu entre les deux compartiments peut parfois amener à penser que la dégradation est nucléaire (Maquat, 2004). Cependant, d'autres voies de régulation participent à la surveillance des ARN viraux et devront être étudiées. Cellesci impliquent très souvent le complexe exosome d'ARN. Ce complexe induit la dégradation des ARN dans le cytoplasme, par exemple après reconnaissance des ARN non-sens par la NDM, mais est également présent dans le noyau lorsque les ARN ne sont pas correctement épissés ou présentent une mauvaise conformation (Kilchert et al., 2016; Zinder and Lima, 2017). En parallèle des expériences d'extinction de la protéine UPF1 intervenant dans la NMD, nous avons prévu de réaliser des expériences d'extinction des différents composants du complexe exosome.

Il est important de noter que la diminution de l'expression de l'ARNpg est exacerbée lors de l'infection avec cette fois-ci un défaut de plus de 10 fois dans la quantité d'ARNpg jusqu'à devenir à peine détectable dans les observations en Northern Blot (Figure 42 et Figure 49). Nous pouvons donc penser que la protéine HBc pourrait jouer un rôle dans la stabilisation des ARN viraux. Nous avons montré que l'expression des ARN du virus HBV HBc-Flag27* pouvait être en partie restaurée lorsque la protéine SRSF1 est éteinte, et que cette extinction augmente également dans une moindre mesure l'expression des ARN du virus sauvage, indiquant que la protéine pourrait réguler l'expression des ARN viraux (Figure 52). Ces résultats sont confirmés par une autre étude montrant une forte diminution de la réplication virale lors de la surexpression de SRSF1 (Duriez et al., 2017). De façon intéressante, SRSF1 a été montrée comme amplifiant les voies de dégradation de la NMD en induisant la reconnaissance précoce des ARNm ciblés par le facteur UPF1 donc une dégradation plus rapide, associée au pore nucléaire (Aznarez et al., 2018; Sato et al., 2008). Bien que les mécanismes induisant la diminution d'expression des ARN viraux semblent être différents dans les pour les deux mutants, il sera intéressant d'étudier l'impact de l'extinction de cette protéine sur l'expression des ARN d'HBV HBc-27*. Il est possible que le facteur soit également impliqué dans les autres mécanismes de dégradation des ARN via l'exosome ARN et que cette dégradation puisse être inhibée par HBc. Un phénomène semblable a été observé pour le virus Epstein Bar (EBV) ou la protéine EB2 interagi avec le facteur SRSF3. Lorsque la protéine virale n'est pas exprimée, la protéine SRSF3 interagit avec le complexe NEXT (nuclear exosome targeting) qui est un adaptateur du complexe ARN exosome (Mure et al., 2018). Encore une fois les expériences d'extinction des différents facteurs du complexe ARN exosome nous permettront de tester de cette hypothèse.

Il est tout de même à noter que dans le cadre de l'expression du virus HBV HBc-Flag27*, le codon stop prématuré n'induit pas une diminution de l'expression de l'ARNpg en transfection (Figure 32B). Il est possible que la présence de la substitution empêche le recrutement des protéines induisant la dégradation. Après avoir compris le mécanisme induisant la déstabilisation de l'ARNpg quand les codons stops sont insérés prématurément dans le gène *HBc*, des approches de R-IP pourront être utilisées pour tester le recrutement des facteurs impliqués sur l'ARNpg HBV HBc-Flag27* en comparaison de l'ARNpg HBV HBc-27*.

Rôle d'HBc régule sur la localisation nucléaire de l'ADNccc

Des études du laboratoire ont montré que l'ADNccc contacte préférentiellement les régions riches en CpG ainsi que les sites d'initiation de la transcription et n'est pas présent dans les régions contactant les lamines qui sont des régions transcriptionnellement réprimées (Moreau et al., 2018). Ces contacts pourraient être importants pour la transcription virale. Une question importante est de comprendre comment le virus est positionné au niveau de ces CpGi. La protéine HBc est un candidat potentiel car il a été montré qu'elle était recrutée sur les CpGi de l'ADNccc (Guo et al., 2011).

Afin de tester cette hypothèse nous avons analysé les contacts de l'ADNccc du virus HBV HBc-27* avec le génome par la technique de chromosome conformation capture Hi-C. Nos résultats montrent que, comme publié par notre équipe, l'ADNccc du virus HBV WT est exclu des lamines et présent au niveau des ilots CpG et des TSS (Moreau et al., 2018). En revanche, nous avons observé que l'ADNccc du virus HBV

HBc-27* est plus souvent présent dans les régions réprimées associées aux lamines (Figure 46). Ces résultats sont très intéressants car nous avons testé plusieurs protéines candidates pouvant être impliquées dans l'adressage de l'ADNccc à la chromatine active comme le facteur CTCF, Cfp1 ou encore la protéine régulatrice HBx sans succès. En effet les résultats ont montré qu'un virus déficient pour HBx, une protéine qui régule l'expression des gènes viraux et cellulaires, contacte comme le virus sauvage préférentiellement la chromatine active au niveau des ilots CpG (Moreau et al., 2018). De la même façon, la localisation de l'ADNccc ne semble pas être modifiée lorsque les cellules sont déplétées pour le facteur Cfp1 qui est présent sur les ilots CpG et est nécessaire à l'activité transcriptionnelle de l'ADNccc (résultats non publiés). Nos résultats semblent donc indiquer que la protéine HBc pourrait favoriser l'adressage d'HBV vers la chromatine active. La littérature indique que la transcription ne se fait pas de façon diffuse dans le noyau mais dans des régions nucléaires appelées Transcription factories (Du and Bai, 2017; Fanucchi et al., 2013; Li et al., 2012). Ces régions enrichies pour certains facteurs de transcription pourraient créer un environnement favorable pour la transcription et favoriser le recrutement de gènes régulés par ces facteurs comme cela a été décrit pour CTCF, KLC et NFkB (Apostolou and Thanos, 2008; Gushchanskaya et al., 2014; Ong and Corces, 2014; Schoenfelder et al., 2010). On peut imaginer que HBc en se fixant sur les ilots CpG favorise le recrutement de l'ADNccc au niveau de régions enrichies pour certains facteurs comme Cfp1. Il sera intéressant de confirmer ce défaut avec le virus HBV HBc-67* et également à différents temps après infection. En effet, ces résultats ont été obtenus 10 jours après infection. Nous avons montré que la protéine HBc apportée avec la capside est toujours présente sur l'ADNccc mais que son recrutement semble décroitre (Figure 39). Il est donc possible qu'à des temps plus longs après infection, lorsque la protéine HBc ne sera plus fixée à l'ADNccc, celui-ci soit localisé de façon complètement aléatoire dans le noyau. De même il serait intéressant de regarder la localisation de l'ADNccc à des temps courts après infection pour voir si les contacts de l'ADNccc sont comparables avec le virus HBV WT.

Recrutement de la protéine HBc provenant de la capside sur l'ADNccc : un rôle dans la formation de l'ADNccc ?

Il a été montré que la protéine HBc se dissocie dans le pore nucléaire afin de libérer l'ADN RC et passe dans le noyau à travers le pore nucléaire (Gallucci and Kann, 2017; Rabe et al., 2003, 2009). Nos résultats ont montré que la protéine HBc est capable de se réassocier sur l'ADNccc dans le noyau. En effet, lors de l'infection par le virus HBV HBc-Flag27* nous avons pu observer le recrutement de la protéine HBc apportée par la capside sur l'ADNccc, indiquant que la protéine libérée dans le pore nucléaire est capable de se réassocier sur l'ADNccc dans le noyau comme présenté dans la Figure 61. De plus nous pouvons toujours voir la présence de la protéine HBc sur l'ADNccc 10jours après infection, même si la quantité semble diminuer alors qu'elle augmente pour le virus sauvage. Dans ce contexte, la protéine HBc pourrait jouer un rôle sur la formation de l'ADNccc et du minichromosome.



Figure 61 : Modèle schématique du recrutement de la protéine HBc provenant de la capside sur l'ADNccc.

1) Entrée du virus et libération de la nucléocapside. 2) transport de la nucléocapisde vers le pore nucléaire. 3) Dissociation de la nucléocapside dans le pore nucléaire, libération de l'ADN RC et de la protéine HBc dans le noyau. 4) Réparation de l'ADN RC en ADNccc et re-association de la protéine HBc provenant de la nucléocapside sur l'ADNccc.

Nous avons pu mettre en évidence l'interaction avec les DNA Topoisomérase I et IIβ et confirmé l'effet de Topo IIβ sur la réplication virale (Figure 58) (Sheraz et al.,

2019). En effet l'extinction de cette protéine diminue l'expression des ARN viraux et semble affecter de la même façon les ARN du virus WT que du virus mutant (Figure 58B). Il sera nécessaire de vérifier l'impact de cette extinction sur la formation de l'ADNccc. En effet, ces protéines interviennent dans la formation de l'ADNccc, et nous pouvons imaginer que le recrutement précoce d'HBc puisse permettre le recrutement des topoisomérases afin de réparer l'ADN RC en ADNccc (Sheraz et al., 2019). De plus nous avons pu également mettre en évidence l'interaction d'HBc avec d'autres protéines impliquées dans les voies de réparation des dommages à l'ADN (DDR : DNA Damage Response) comme la protéine USP3, une hydrolase qui permet la déubiquitination des histones H2A et H2B mais également du variant H2AX (Sharma et al., 2014). Ce variant d'histone qui interagit également avec HBc est impliqué dans les mécanismes de DDR. Sa phosphorylation (yH2AX) est la première étape pour permettre le recrutement de la machinerie DDR. La protéine TDP2 également impliquée dans la DDR a également été montré comme étant impliqué dans la formation de l'ADNccc en coupant la liaison covalente entre l'ADN RC et HBV Pol (Königer et al., 2014). Ces résultats suggèrent que la voie de réparation des dommages à l'ADN pourrait être impliquée dans la formation de l'ADNccc à plusieurs étapes et que ces interactions pourraient être facilitées par le recrutement précoce d'HBc sur l'ADN RC.

Ces résultats nous indiquent également que la demi-vie de la protéine HBc est très longue. De façon très intéressante, les protéines histones, qui interagissent avec les protéine HBc (Figure 56) sont des protéines qui ont également une demi vie très longue, pouvant aller jusqu'à 117 jours dans les cellules de foies (Commerford et al., 1982). Nous avons également montré que la protéine HBc interagit avec les protéines histones (Figure 56). De plus, tout comme les histones, la protéine HBc est une protéine riche en arginine, qui modifie la structure de l'ADNccc. Ces données nous font dire que la protéine HBc pourrait être assimilé aux protéines histones et intervenir dans la formation du minichromosome.

Le mutant HBV HBc-67* : un bon candidat pour étudier le rôle d'HBc sur la régulation de l'ADNccc.

Le mutant HBV HBc-67* semble être un bon candidat afin d'étudier le rôle d'HBc sur la régulation des ARN viraux. En effet celui-ci ne possède pas de substitution importante dans le génome viral (5 nucléotides mutés), et ne montre pas de défaut d'expression des ARNpg lors de la transfection du plasmide permettant son expression (Figure 47). Ces résultats indiquent que la présence du codon stop ne semble pas influer sur l'expression des ARN viraux lorsque HBc est présent. De plus, ce virus possède seulement une mutation de 5 nucléotides afin d'insérer le codon stop, et celles-ci sont d'autant plus éloignées des séquences régulatrices de la maturation des ARN que la mutation est insérée au 67^e codon.

Lors de l'infection, nous observons une réduction d'environ trois fois de la quantité d'ARN viraux, suggérant un effet dépendant d'HBc et non dépendant comme pour les mutants HBV HBc-27 et HBV HBc-38 de la déstabilisation de l'ARNpg dû au déplacement du codon stop dans la quantité d'ARN viraux (Figure 49). Une approche par northern blot sera nécessaire afin de déterminer quels ARN viraux sont touchés. Il a été montré qu'HBc permet de modifier la structure du minichromosome en diminuant l'espacement entre les nucléosomes (Bock et al., 2001). Les mécanismes induisant cette diminution ne sont pas encore connus. Plusieurs travaux semblent indiquer qu'HBc puisse avoir un rôle sur la régulation transcriptionnelle de l'ADNccc. Il a par exemple été montré une réduction de la transcription virale lors d'une infection par le virus DHBV déficient pour HBc (Schultz et al., 1999). De plus le recrutement de la protéine core sur les ilots CpG est associé à un état permissif de l'ADNccc avec des ilots CpG déméthylés (Guo et al., 2011). La protéine est également capable d'augmenter le recrutement du facteur NFkB sur le promoteur preC/C/EnhII et augmente son activité (Kwon and Rho, 2002). Enfin il a été montré que la protéine était capable de réguler l'expression des gènes cellulaires (Du et al., 2009; Guo et al., 2012; Li et al., 2019; Xiang et al., 2015).

La protéine HBc interagit notamment avec l'Histone H1. Les études d'interactomique de la protéine H1 ont montré de nombreux partenaires similaires à ceux obtenus et confirmés avec la protéine HBc comme le complexe FACT et la protéine SRSF1 mais également la nucléophosmine, un partenaire dont l'interaction avec HBc est publiée (Kalashnikova et al., 2013; Lee et al., 2009). Le linker H1 est majoritairement connu pour condenser l'ADN et donc induire un état réprimé de la chromatine (Zlatanova, 1990). Cependant son rôle n'est pas si strict. Certains variants, dont le variant H1.3 obtenu dans notre analyse de spectrométrie de masse, sont associés à l'euchromatine et les expériences de suppression de l'extinction de l'Histone H1 induisent la répression de certains gènes (Kalashnikova et al., 2016;

Shen and Gorovsky, 1996). Il sera intéressant d'analyser par ChIP-qPCR le recrutement de l'Histone H1, mais également des autres histones et des modifications post traductionnelles des histones lors de l'infection HBV HBc-67* afin de voir si l'absence d'expression d'HBc modifie ces signaux sur l'ADNccc.

Interaction d'HBc avec le complexe FACT

Nous avons pu mettre en évidence une interaction entre la protéine HBc et le complexe FACT. Ce complexe est un l'hétérodimère des protéines SSRP1 et SPT16 et permet de faciliter le passage de l'ARN Pol II lors de la transcription (Mason and Struhl, 2004; Orphanides et al., 1998; Saunders et al., 2003). Le complexe contrôle la déposition des histones sur l'ADN et par ce biais régule de nombreux évènements nucléaires comme la transcription, la réplication de l'ADN ainsi que les voies DDR (Belotserkovskaya et al., 2003; Birch et al., 2009; Jamai et al., 2009).

L'interaction d'HBc avec les deux protéines du complexe a pu être confirmée dans les cellules HelaS3 exprimant HBcY132A mais également dans les cellules hépatocytaires HepaD38 qui possèdent une intégration stable du génome viral et permet l'expression des protéines virales dont HBc (Figure 53A et B). Nous avons également étudié le rôle de l'interaction d'HBc avec ce complexe. Par des expériences d'extinction du complexe nous avons pu voir que la transcription du virus HBV HBc-Flag27* n'était pas impactée, contrairement à celle du virus HBV WT qui est augmenté d'environ deux fois (Figure 54C). De façon intéressante, il a été montré que le complexe FACT est impliqué dans la répression de sites de transcription cryptiques (Kaplan et al., 2003; Mylonas and Tessarz, 2018; Nielsen et al., 2019). Cette inhibition par FACT pourrait permettre d'expliquer l'augmentation de la quantité d'ARN viraux lors des expériences d'extinction de la protéine. Des expériences de Northern blot seront nécessaires afin de confirmer que l'augmentation de la transcription observée en l'absence du complexe FACT est due à l'utilisation de sites d'initiation cryptiques. Nous avons également pu observer le recrutement de la protéine SPT16 sur l'ADNccc du virus HBV WT, mais pas sur l'ADNccc du virus HBV HBc-, ce qui confirme qu'HBc joue un rôle sur le recrutement du complexe sur l'ADNccc (Figure 55). La réplication de plusieurs virus est régulée par ce complexe. La protéine SSRP1 interagi avec LEDGF/P75 (lens epithelium-derived growth factor/P75), un cofacteur nécessaire à l'intégration du VIH, et module la réplication virale (Lopez et al., 2016). Par la suite, les travaux ont montré que cette interaction influençait l'intégration du VIH et qu'un complexe à 3 éléments peut être formé avec LEDGF/P75, le complexe FACT et l'intégrase virale, permettant l'intégration. Dans ce contexte, la surexpression du complexe FACT augmente l'intégration du VIH (Matysiak et al., 2017). L'intégration du virus de la leucose aviaire (ALV) est également régulée par le complexe FACT, qui interagit avec l'intégrase de ce rétrovirus (Winans et al., 2017). Une autre étude a en revanche identifié le complexe FACT comme un facteur de restriction du VIH grâce à un crible de siARN. Cette étude a montré l'interaction de Tat avec SPT16h et les expériences d'extinction du complexe FACT montrent une augmentation de la transcription à partir des LTR. Ces résultats seraient expliqués par une compétition du complexe avec des facteurs proviraux pour la fixation sur ces LTR. Ces expériences ont été réalisées dans des lignées où le virus était déjà intégré (Huang et al., 2015). Le complexe semble donc avoir des effets proviraux ou antiviraux selon les conditions. Lors des expériences de déplétion nous observons une augmentation de la quantité des ARN viraux. Cette augmentation peut refléter une levée de la répression des promoteurs cryptiques mais pourrait aussi refléter une réelle répression des promoteurs viraux par le complexe FACT. La répression induite par le complexe diminue de seulement deux fois la transcription virale il est possible que le recrutement du complexe sur l'ADNccc par HBc puisse permettre de limiter la réplication virale afin que le virus puisse échapper à la réponse immunitaire.

Pour conclure, ces travaux ont permis de découvrir plusieurs mécanismes de régulation des ARN viraux non décrits jusque-là. Une région présente dans entre les positions 1981 et 2308 du génome semble contenir un élément qui pourrait réguler les événements tardifs de la transcription comme la polyadénylation. Le virus semble également avoir établi une stratégie afin que le codon stop d'HBc ne soit pas reconnu comme un codon stop précoce par les voies de surveillances des ARN et nous avons montré que si ce codon stop est déplacé cela induit une diminution de l'expression de l'ARNpg. La protéine HBc semble être impliquée dans la régulation de la biologie des ARN car le phénomène de déstabilisation induit par le déplacement du codon stop est amplifié en absence d'HBc dans le contexte de l'infection par le virus HBV HBc-27*. Par ailleurs lors de l'infection, nous observons en plus de la diminution de l'expression des ARNpg celle des ARN codant les protéines de surface suggérant qu'HBc a un rôle direct sur l'expression des ARN viraux. Cette hypothèse est supportée par le fait que

le virus HBV HBc-67* présente un défaut au niveau de l'expression des ARN viraux uniquement dans le contexte de l'infection. Nous n'avons cependant pas mis en évidence si ce mécanisme est transcriptionnel ou post-transcriptionnel. L'étude du rôle d'HBc sur la formation et la transcription de l'ADNccc ainsi que l'expression des ARN viraux est difficile car nous avons pu mettre en évidence que la protéine venant avec la capside était recrutée sur l'ADNccc dès sa formation. Ce mécanisme, s'il suggère qu'HBc peut être impliqué dans la formation de l'ADNccc et sa transcription, représente un important obstacle pour l'étude du rôle d'HBc. Cependant nous avons observé que si HBc est en effet recrutée sur l'ADNccc du virus sauvage comme du virus déficient pour HBc et ce de façon prolongée dans le temps, son niveau tend à baisser alors que celui du virus sauvage augmente. Nos résultats préliminaires ont cependant permis de montrer qu'à jour 10 après infection, ce qui correspond à un temps ou le niveau d'HBc sur l'ADNccc du virus déficient pour HBc est inférieur à celui d'un virus sauvage, l'ADNccc n'est plus exclu des régions réprimées contactant les lamines contrairement au virus sauvage qui est exclu de ces régions. Ces résultats suggèrent que la protéine HBc pourrait intervenir dans l'adressage de l'ADNccc vers les régions actives de la chromatine favorisant ainsi sa transcription. Pour finir, nous avons pu mettre en évidence l'interaction d'HBc avec de nombreuses protéines impliquées dans les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN et des protéines histones, mais également avec le complexe FACT. Nos résultats montrent que FACT semble recruté sur l'ADNccc plus fortement lorsque le niveau d'HBc est élevé et qu'il intervient sa régulation transcriptionnelle.

Dans l'ensemble, ces résultats permettent de mieux comprendre les mécanismes régulant la biologie des ARN viraux, et le rôle de la protéine HBc sur ces mécanismes.

Matériel et méthodes

Cellules et milieux de culture

Les cellules d'hépatomes HepG2 sont cultivées en milieu Dulbecco's modified Eagle's Medium F12 (DMEM/F12) (Life Technologies) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 100U/ml de pénicilline, 0.1mg/ml de streptomycine, 0.2 µg/ml d'hydrocortisone et 5µg/ml d'insuline. Lors de la production virale celles-ci sont maintenues en milieu de production composé de milieu William's (Life technologie) supplémenté par 5% de SFV, 2% de DMSO, 100U/ml de pénicilline, 0.1mg/ml de streptomycine, 35 x µg/ml d'hydrocortisone et 5µg/ml d'insuline.

Les lignées HepaD38 sont issues des lignées HepG2 et contiennent une intégration de 1,2 copies du génome viral sous contrôle d'un promoteur inductible à la tétracycline. Elles sont cultivées dans le même milieu que les cellules HepG2.

Les cellules HepG2NTCP (exprimant stablement le NTCP), les cellules 293T (cellules embryonnaires de rein exprimant l'antigène grand T du SV40), et les cellules HelaS3 (dérivées d'un cancer du col de l'utérus) sont cultivées en milieu DMEM (Life Technologies) supplémentés par 10% de SVF, 100U/ml de pénicilline et 0.1mg/ml de streptomycine.

Les hépatocytes primaires humains ont été fourni par la compagnie Corning (Ref : 454541 / Lot #342) et sont cultivé dans du milieu de culture pour hépatocytes selon les recommandations du fournisseur (Corning, ref : 355056, hepatocyte culture media kit, 500ml).

Ces cellules sont cultivées à 37° C avec une pression partielle atmosphérique en O₂ et une pression de 5% de CO₂.

Les lignées HelaS3-HBc, HelaS3-HBcY132A et HelaS3-Mock sont cultivées en CO2 independant medium (Life technologies) supplémenté avec 10% de SVF, 100U/ml de pénicilline, 0.1mg/ml de streptomycine et 2mM de L-Glutamine à 37°C lors de la culture en suspension avec une pression partielles atmosphérique en CO₂.

PCR quantitative

Les analyses par PCR quantitative (qPCR) sont réalisées sur l'appareil QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR (Applied Biosystems). La réaction se fait avec 5 μ L d'échantillons avec 5 μ L de Sybr Green PCR Master Mix (Roche) additionné des amorces spécifiques à 5 μ M finale. Les réactions d'amplification sont effectuées selon le protocole suivant : 2 min à 50°C, 10 min à 95°C, 40 cycles de 10s à 95°C et 1 min à 60°C. Pour les quantifications de la production virale une technique de quantification absolue est réalisée grâce à une gamme étalon à partir du plasmide payw1.2. Pour les autres expériences une quantification relative est utilisée grâce à la technique du Δ Ct grâce au calcul : 2- Δ Ct où Δ Ct = Ct _{gène cible} – Ct _{gène ref}.

Production de virus, dosage et infection

Le plasmide payw1.2 contient 1,2 copies du génome du VHB et est utilisé pour produire le VHB sauvage. Le plasmide prHBV1.3-HBc-Flag27*/HBc a été construit par mutagenèse dirigé à partir du plasmide prHBV1.3-HBc-Flag/HBc donné par Q. Deng (Deng et al., 2009). Il contient 1,3 copies du génome du VHB avec une délétion de 323 nucléotides et une insertion d'une séquence de 180 nucléotides codant des épitopes dont l'épitope Flag, en phase avec le cadre de lecture d'HBc. Un codon stop a été inséré en amont de cette séquence afin d'inhiber l'expression de la protéine HBc recombinante et seuls les 27 premiers acides aminés d'HBc sont exprimés. De plus ce plasmide code pour la protéine HBc sauvage sous le contrôle du promoteur SV40 permettant la production de particules virales. Les plasmides prHBV1.3HBC-27*TAATAA/HBc prHBV1.3HBC-27*TAA/HBc, prHBV1.3HBC-Flag38*TAATAA/HBc, prHBV1.3HBC-Flag67*TAATAA/HBc, prHBV1.3HBC-Flag67*TAG/HBc ont été clonés à partir de ce plasmide en introduisant la séquence sauvage par la technique de Gibson Assembly selon le protocole fournisseur (NEB) puis par introduction du codon stop aux positions indiqués par mutagenèse dirigée avec le kit QuickChange II XL selon le protocole du fournisseur (Agilent).

Les virus sont produits par transfection des HepG2 par les plasmides précédemment décrit. Les cellules HepG2 sont ensemencées à 15.10⁶ cellules dans des flasques T175 collagènées et transfectées par 30µg d'ADN plasmidique par X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche) selon le protocole du fournisseur. Le lendemain, le milieu de culture est remplacé par du milieu de production et le surnageant est récolté 5 puis 10 jours après transfection puis filtré (filtre 0.45µm). Les surnageants de cultures sont traités avec 10U/ml de DNase I recombinante (Roche) et 1ug/ml de MgCl2 pendant 1h à 37°C.

Purification

 ∂ Ultracentrifugation sur coussin de succrose.
Le virus est concentré sur coussin de sucrose (20% sucrose en TNE : 10mM TrisHCl pH7.5, 100mM NaCl, 1mM EDTA) par ultracentrifugation avec un rotor SW32-Ti à 32 000 rpm pendant 4 heures à 4°C. Les culots sont repris en DMEM (Gibco).

 ∂ Gradient de iodixanol.

Un gradient discontinu de iodixanol est établit avec des fractions de 2,3 ml de iodixanol dilué dans du DMEM aux densités de 1.15, 1.18, 1.21, 1.24 et 1.27 g/ml. 100ul de production virale préalablement concentré par ultracentrifugation sont déposés au-dessus de ce gradient. Les particules virales sont ensuite séparées par ultracentrifugation avec un rotor SW41-Ti à 40 000rpm pendant 16h. Des fractions d'environ 500µl sont récupérées et analysées.

∂ Purification par chromatographie d'affinité avec l'héparine.

Les surnageants filtrés sont chargés sur une colonne d'héparine (HiTrap Heparine HP – 1ml – GE Healthcare) à température ambiante grâce à une pompe péristaltique. L'élution se fait ensuite grâce un appareil ÄKTAprime plus (GE Healthcare) avec un tampon A : 140mM NaCl, Tris-HCl 20mM pH 7,4 et tampon B : 2M NaCl Tris-HCl 20mM pH 7,4 et le programme suivant : Tampon A 10ml ; gradient linéaire du tampon A vers B 10 ml ; Tampon B 10ml ; Tampon A 20ml. Les densités optiques ont été mesurées par absorption des longueurs d'ondes 254 et 280nm et les fractions correspondant à l'élution du virus a été récupérée (Pic à environ 340mM NaCl).

Titrage des productions virales

Seules les particules virales enveloppées contenant l'ADN-RC et donc infectieuses sont quantifiées lors du calcul de la MOI (Multipicity of infection). Pour cela les particules virales enveloppées sont immunoprécipitées avec un anticorps dirigé contre la protéine d'enveloppe L (anti-pré-S1 fourni par Camille Sureau) à partir de 20µl de surnageant viral incubés sur la nuit sous agitation à 4°C. 40µl de billes magnétiques couplée aux protéines A et G (ChIP-Grade Life technologies) sont ajoutés aux extrait et incubés à 4°C durant 2h sous agitation. Après 4 lavages avec du PBS (Phosphate buffered saline), les particules virales sont éluées et digérées avec un tampon contenant 1% SDS, 0,1 M NaHCO3, TrisHCl pH 6.5 et 0.8mg/ml de protéinase K pendant 1h à 56°C. L'ADN viral est purifié par extraction au phénol chloroforme isoamyl alcool (vol/vol) puis précipitation avec 1/10e de volume d'acétate de sodium 3M pH 5,5, 3µl de glycogène et 1 volume d'isopropanol. Les culots d'ADN

sont rincés avec 1ml d'alcool 70% puis resuspendus dans 50µl d'eau. Une PCRq est réalisée sur les échantillons et sur une gamme étalon du plasmide payw1.2 avec les amorces sens et antisens ciblant l'ADN RC.

Analyse du gradient de lodixalnol

Afin de quantifier l'ADN présent dans les fractions issues de la séparation L'ADN présent dans les fractions de iodixanol, 50ul d'extrait sont digéré par de la Protéinase K dans un tampon composé de 1% SDS, 0,1 M NaHCO3, TrisHCl pH 6.5 et 0.8mg/ml de protéinase K durant pendant 1h à 56°C. L'ADN est ensuite extrait par la technique de phénol Chloroforme et précipitation isopropanol comme précédemment décrit. L'ADN est ensuite analysé par qPCR avec des amorces spécifiques de l'ADN RC ainsi qu'une gamme étalon établie grâce au plasmide payw1.2.

Afin d'analyser les protéines présentes dans les fractions, 5ul de chaque fraction sont déposées sur une membrane de nitro cellulose. La membrane est ensuite bloquée dans du PBS/0.1%Tween20(PBST)/5%lait pendant 2h puis les anticorps α -HBs et α -HBc sont ajoutés et les membranes sont incubées pendant 2h. Les membranes sont ensuite rincées 3 x PBST puis incubées avec les anticorps secondaires fluorescent anti-souris IgG DyLight 800 conjugate (Thermoscientific #35521) et anti-lapin IgG DyLight 800 conjugate (Thermoscientific #35571) dilués au 1/10000e en PBST. Après 3 lavages de 5 min en PBST et 1 lavage en PBS, les protéines marquées par la fluorescence sont révélées et quantifiées par un scanner Odyssey CLx et le programme Odyssey software 3.1 (Li CorBiosciences).

Infection

Les cellules HepG2NTCP sont infectées à la Multiplicité d'infection (MOI) désirée (100 à 500 génomes équivalent/cellule) dans un milieu DMEM avec 4% de PEG et 3% DMSO. Le lendemain, le milieu est remplacé par du milieu DMEM précédemment décrit supplémenté de 3% DMSO. Le milieu est changé après 4 jours d'infection.

Les hépatocytes primaires humains sont infectés à une MOI de 500génomes équivalent par cellule dans du milieu pour hépatocyte supplémenté de 4% PEG/3%DMSO. Le lendemain de l'infection le milieu est remplacé par du milieu pour hépatocyte supplémenté de 3% DMSO.

Extraction des ARNs et quantification par RT-PCRq

Les ARNs sont extraits des cellules selon le protocole du kit TRIzol® RNA Isolation Reagents (Life Technologies). Brièvement, les cellules sont lysées dans 1ml de TRIzol puis 200µl de chloroforme sont ajoutés. Après centrifugation, la phase aqueuse contenant les ARN est prélevée et les ARN sont précipités dans 1 volume d'isopropanol. Afin d'éliminer l'ADN contaminant les ARNs purifiés sont traités à la TURBO™ DNase (Life Technologies) suivant le protocole du fournisseur, puis 500ng d'ARN sont rétrotranscrits en ADNc grâce à des amorces OligodT et l'enzyme RevertAid H Minus M-MuLV reverse transcriptase (Fermentas) selon le protocole du fournisseur. Le gène Rhot2 est utilisé comme gène de référence car son expression varie peu dans les lignées hépatocytaires et le détail des amorces utilisées se trouve dans le Tableau 2.

Northern Blot

Les ARN sont extraits comme décrit précédemment et dénaturés pendant 10minutes à 70°C dans du tampon RNA Gel Loading Dye (ThermoScientifique) puis 15µg sont déposés sur un gel d'agarose 1,2% agarose, 1% formaldéhyde dans du tampon phosphate 20mM. La migration est ensuite effectuée pendant 6h à 50V. Les ARN sont ensuite transférés par capillarité sur membrane AmershamHybond N+ (GE Healthcare) pendant 16h en tampon SSC 20X. Les membranes sont ensuite fixées par incubation pendant 2h à 80°C puis incubées en tampon d'hybridation DIG easy Hyb[™] (Roche) pendant 2h minimum à 42°C. Des sondes correspondantes au génome viral ont été amplifiées à partir du plasmide PFC80 qui contient 4 copies du génome virale en tandem dans un vecteur pBR322 grâce au kit PCR DIG Probe synthesis Kit (Roche) avec les amorces décrites dans le Tableau 2. La membrane est incubée pendant 16h avec les sondes HBV DIG à 42°C diluées en tampon DIG easy Hyb[™] puis révélées avec le *DIG luminescent detection kit* (Roche) et le réactif CDP Star.

Extraction d'ADNccc et quantification par PCRq

Les cellules sont lysées dans un tampon de fractionnement (100mM tris HCl, 0,0375%NP40) puis centrifugées à 13 000g pendant 1min. Le culot correspondant aux noyaux est ensuite rincé en tampon de lyse puis en PBS. L'ADN est ensuite extrait des cellules avec le kit DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) selon le protocole du

133

fournisseur. L'ADNccc est quantifié par qPCR, avec des amorces spécifiques de l'ADNccc et rapporté au gène de la cycline.

Western Blot

Les cellules sont lysées dans du tampon CHAPS (50mM TrisHCl pH 7,5, 5mM EDTA, 140mM NaCl, 1% CHAPS, 5% Glycérol) pendant 20 minutes à 4°C, puis centrifugées à 13 000g pendant 20min à 4°C. La concentration protéique est déterminée par la technique de Bradford en utilisant une gamme étalon de BSA (Bocine Serum Albumine). Les extraits sont ensuite dilués dans du tampon NuPAGE® LDS Sample Buffer 1X suplémenté de 0,05M de Dithiothréitol, et dénaturées 10 min à 70°C. Les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide pré-coulé NuPAGE® 4-12% Bis-Tris (Life technologies) et transférées sur membrane de nitrocellulose. Après blocage de la membrane pendant 2h avec du PBST/5%lait, la membrane est incubée durant 2h avec les anticorps primaires dilués dans du PBST/5%lait. La membrane est ensuite lavée 3 fois 5 min en PSBT puis incubée avec les anticorps fluorescent anti-souris IgG DyLight 800 conjugate (Thermoscientific #35521) et anti-lapin IgG DyLight 800 conjugate (Thermoscientific #35571) dilués au 1/10000e en PBST. Après 3 lavages de 5 min en PBST et 1 lavage en PBS, les protéines marquées par la fluorescence sont révélées par un scanner Odyssey CLx et le programme Odyssey software 3.1 (Li CorBiosciences).

Pour le western Blot natif, les extraits ont été lysées dans du tampon de lyse 1x Native Sample Buffer (ThermoFisher scientific) + 1% DDM. Les extraits ont ensuite été centrifugés 45min à 13 000g, 4°C puis déposé sur gel de polyacrylamide NativePAGE 3%-12% bis-tris gel (ThermoFisher Scientific). Du tampon 1X Native Anode Buffer est ajouté du coté de l'anode dans la cuve de migration. Du coté de la cathode, du tampon 1X Native DarkBlue cathode Buffer va être utilisé lors du début de la migration puis remplacé par du 1X Native LightBlue cathode Buffer lorsque la migration a atteint 1/3 du gel. Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose dans du tampon de transfert composé de 38,4mM Glycine, 1,5mM Tris pH7,5, 7,5% Ethanol, 0,02%SDS pendant 16h à 400mA constant.

Après blocage de la membrane pendant 2h avec du PBST/5%lait, la membrane est incubée durant 2h avec les anticorps primaires dilués dans du PBST/5%lait. Après 3 lavages en PBST, les extraits sont incubés avec les anticorps secondaires α-rabbit-

HRP et révélés avec le kit Pierce ECL Plus Western Blotting substrate (ThermoFisher scientific).

Analyse de la sécrétion HBsAg par ELISA

La protéine HBs présente dans les surnageants de cultures ont été quantifiés en ELISA par le kit Monolisa HBsAG ULTRA (Biorad) grâce à une gamme étalon grâce à de la protéine HBsAg préalablement titrée (Architect HBsAg Calibrators, Abbott).

Quantification des ARN naissants

Afin de quantifier les ARN naissant, les cellules sont incubées avec le nucléoside Ethynyl Uridine (EU) a une concentration de 0,5mM dans du DMEM pendant 1h ou 2h et les ARN sont directement extraits. Les ARN marqués sont purifiés grâce au kit Click-iT® Nascent RNA Capture (Thermosfisher) selon le protocole du fournisseur. Les ARN sont ensuite traités à la DNase puis rétrotranscrit comme décrit précédemment et analysés par qPCR avec des amorces spécifiques des ARN viraux rapportés au gène de ménage Rhot2.

Immuno-précipitation de chromatine (ChIP)

Les cellules sont fixées grâce à une solution de PBS 1X, 1% formaldéhyde pendant 15 min à température ambiante. Après centrifugation 5 min à 100g, la réaction est stoppée par une solution de 0.125M glycine puis les cellules sont lavées 2 fois en PBS 1X. Les cellules sont ensuite récupérées en PBS et les membranes cellulaires sont lysées mécaniquement avec des billes CK14 Precellys (KT03961-203.05) avec deux cycles de 30s à 6700 rpm. Les noyaux sont ensuite récupérés dans le tampon ChIP présent dans le kit ChIP-IT Hight sensitivity (Active Motif) et soniqués pendant 4 minutes à 4°C (30s ON/ 30s OFF). Les étapes suivantes d'immunoprécipitaion et de purification d'ADN sont réalisées avec le kit ChIP-IT Hight sensitivity (Active Motif) suivant le protocole fournisseur. Les échantillons sont quantifiés en qPCR avec des amorces spécifiques de l'ADNccc et ont été rapporté à la quantité d'ADN dans les extraits avant immunoprécipitation (input) 2- Δ Ct où Δ Ct = Ctéchantillon – Ctinput. + log(Vechantillon/Vinput).

Production de vecteurs retroviraux

Les plasmides pTRIP Mock, pTRIP HBc et pTRIP HBx sont issus du plasmide pTRIP qui permet la formation de particules lentivirales et l'expression de protéine dans des cellules après transduction. L'expression de ces protéines est rendue possible grâce à la présence d'un promoteur CMV. Le plasmide pCMV-dR8.91 va permettre l'expression des protéines Gag-Pol du VIH afin de produire les vecteurs lentiviraux. Les plasmides pOZ-HF-Mock, pOZ-HF-HBc et pOZ-HF-HBcY132A permettent la production de vecteurs rétroviraux issus du murine leukemia virus (MuLV) et l'expression de protéine de fusion avec une étiquette HA-Flag en N-terminal. Ce vecteur permet également l'expression via un IRES (Internal ribosome entry site) du récepteur α de l'interleuline 2 (IL2-R α) ce qui permettra de sélectionner les cellules transduites. Les plasmides pLKO.1 sh control, pLKO.1 sh Topol, pLKO.1 sh Topollb vont permettre l'expression des lentivecteurs utilisés pour l'extinction des topoisomérase. Le plasmide pGag-Pol-MLV permet l'expression des protéines Gag-Pol du (MuLV) afin de produire les vecteurs rétroviraux. Le plasmide pVSVG-Env permet d'exprimer la protéine d'enveloppe du virus de la stomatite vesiculaire (VSV) afin d'envelopper ces vecteurs.

Les vecteurs lentiviraux et rétroviraux sont produits par transfection au phosphate de calcium en HEK 293T ensemencées à une densité de 1,2.107 cellules dans une flasque de 175cm2. 20µg de plasmide codant les protéines Gag-Pol adéquats, 10µg de pCMV-VSV-G et 20µg du codant la protéine d'intérêt sont dilués dans 1ml de CaCl2-2H2O 250mM (Sigma). Ce mélange est par la suite ajouté goutte à goutte sous agitation à 1ml de tampon HBS 2X (270mM NaCl, 1mM KCl, 2.8mM Na2HPO4, 11mM glucose et 42mM de Hepes) et ajouté aux cellules. Après trois jours d'incubation, le surnageant des cellules est filtré (0,2µm) puis les lentivirus sont concentrés par ultracentrifugation sur coussin de sucrose 20%/TNE à 28 000 rpm pendant 1h 30min.

Microscopie elctronique

Les particules virales ont été purifiées sur colonnes d'héparines puis fixées avec 2% de paraformaldéhyde (PFA) finale. Les échantillons ont ensuite été traités par la plateforme de microscopie électronique de Tours dirigée par Philippe Roingeard.

Immunofluorescence

Les cellules sont cultivées sur lamelles de verres préalablement collagénées. Après avoir été rincées 2 fois en PBS, les cellules sont fixées avec une solution de PFA 4% (Santacruz) à température ambiante pendant 15min. Les cellules sont ensuite perméabilisées avec une solution de TritonX100 1%/PBS pendant 10min à température ambiante puis bloquées avec un tampon 5%BSA/10%SVF/PBST pendant 1h. Les anticorps sont incubés pendant 1h à température ambiante puis les lamelles sont rincées 5 fois en PBST. Les lamelles sont ensuite incubées avec les anticorps secondaires Alexa Fluor 594 anti-souris, et Alexa Fluor 488 anti-lapin (Invitrogen A-11005 et A-11034) dilués au 1/2000. Les lamelles sont ensuite montées sur lame de verre et observées au microscope à épifluorescence Zeiss Axio Imager Z2 microscope avec un objectif Pln-Apo 63X/1.4. Les images ont été acquises et traitées avec le logiciel ZEN blue 2012 software (Carl Zeiss).

<u>Séquençage de l'ADN RC</u>

L'ADN extrait des particules virales lors du titrage des production virales a été amplifié par PCR avec les amorces 1 et 2 décrite dans les travaux de Gunther et al. puis ces fragments de PCR ont été clonés dans le vecteur PCR II TOPO selon les directives du fournisseur (Thermofisher). Les plasmides obtenues pour 4 colonies ont été séquencées (Günther et al., 1997).

Chromosome conformation Capture Hi-C

Les cellules infectées ont été fixées avec 1% de formaldhéyde puis analysées comme décrit dans les travaux de Moreau et al., 2018. Rapidement, cette technique est constituée de 4 étapes majeures : (i) Fixation des complexes protéines-ADN au formaldéhyde. Les régions du génomes proches physiquement sont maintenues ensemble par des liaisons covalentes. (ii) Digestion du génome par une enzyme de restriction. (iii) Religation en condition très diluée. Les extrémités cohésives de deux fragments capturés ensemble se religuent pour former un fragment chimérique constitué de deux régions distinctes du génome. Afin d'enrichir le mélange en molécules informatives, les événements de religation sont purifiés par biotine-streptavidine. (iv) Séquençage paired-end des deux extrémités du fragment. Le positionnement des reads sur un génome de référence permet de retrouver les régions qui étaient en contact. Une étape de capture des séquences virales a été ajoutée avec des sondes spécifiques de l'ADNccc afin d'enrichir en séquences virales.

Etablissement des lignées HelaS3-Flag -HA par transduction rétrovirale



Pour la transduction rétrovirale, 3.10⁶ cellules HelaS3 sont incubées pendant

Figure 62 : Préparation des banques Hi-C

2h à 37°C avec 50µl de stock viral et 4µg/ml de polybrène puis le milieu est changé et les cellules sont remises en culture. Les cellules transduites sont sélectionnées 3 jours après transduction au moyen de billes magnétiques (Dynabeads® Pan Mouse IgG – Life technologies) couplées à un anticorps anti-IL2R α (Upstate Biotechnology). Les cellules sont sélectionnées 3 fois et la transduction des cellules est vérifiée par western blot et immunofluorescence.

Purification des partenaires nucléaires d'HBc

Préparation des extraits nucléaires de cellules HeLa-S3

Les cellules HelaS3 sont des cellules semi-adhérentes et peuvent donc être cultivées en suspension dans des volumes importants. Après sélection, les lignées HelaS3 sont ensemencées dans 1,5L de CO2 independant medium à 2.105 cellules/ml et incubées pendant 4 jours à 37°C jusqu'à atteindre environ 5.105 cellules/ml. Les cellules sont centrifugées 5 min à 0.2g et lavées au PBS 1X. Les cellules sont ensuite incubées dans du tampon hypotonique (Tris pH7.3 10mM, KCl 10mM, MgCl2 1,5mM, PMSF 0.2mM, β ME 10mM) et centrifugées pendant 5 min à 1500rpm. Le volume des cellules est alors mesuré (=SCV) et doit être supérieur au volume des cellules recueilli. Les cellules sont resuspendues dans 2 fois le volume SCV puis incubées sur glace

pendant 10 min et lysées mécaniquement grâce à un piston de Dounce. Les noyaux sont alors centrifugés (culot = NPV). Après resuspension des noyaux dans NPV/2 volumes de tampon Low salt (Tris pH7.3 20mM, KCl 20mM, MgCl2 1,5mM, EDTA pH8.0 0.2mM, Glycérol 25%, PMSF 2mM), le même volume de tampon High salt (Tris pH7.3 20mM, KCl 1.2M, MgCl2 1,5mM, EDTA pH8.0 0.2mM, Glycérol 25%, PMSF 2mM, βME 10mM) est ajouté sur la suspension goutte à goutte sous agitation. L'extrait nucléaire est incubé à 4°C sous agitation durant 1h afin de lyser les noyaux. Les extraits nucléaires sont alors centrifugés et pour purifier les extraits et éliminer les sels, le surnageant est dialysé pendant 3×1h avec des cassettes Slide-A-Lyser (Life technologies, #66203) dans du tampon de dialyse à 20mM Tris-HCl pH7,9, 20% glycérol, 100mM KCl, 0.2mM EDTA, 1mM DTT. Les extraits dyalisés sont congelés dans de l'azote et conservés à -80°C pour la purification des partenaires de HBc.

Purification des partenaires par TAP/TAG

Afin d'éliminer les interactions non spécifiques, deux purifications successives, Flag puis HA, sont réalisées selon le protocole de Nakatani et Ogryzko (Nakatani and Ogryzko, 2003). Les extraits sont incubés pendant 3h à 4°C sous agitation avec des billes d'agaroses conjuguées Anti-Flag M2 (Sigma A2220) à une concentration de 4µl de billes pour 100µl d'extrait. Les billes sont ensuite rincées 4 fois avec du tampon de lavage (20mM Tris HCl pH 8.0, 100mM KCl, 5mM MgCl2, 0,2mM EDTA, 10%Glycerol, 0,1% Tween, 10mM 2-mercaptoethanol et 0,25mM phenylmethylsulfonyle). Les protéines sont ensuite éluées avec deux volumes de billes de tampon d'élution flag (0,2mg/ml Flag peptide dans du tampon de lavage) sous agitation pendant 1h à 4°C avec agitation. L'étape d'élution est répétée afin d'augmenter la quantité de protéines éluées. Les extraits ainsi purifiés sont ensuite incubés avec des billes d'agarose conjuguées anti-HA (SantaCruz sc-7392 AC) pendant 3h sur roue à 4°C. Les billes sont ensuite rincées 3 fois en tampon de lavage et éluées avec du tampon d'élution HA (50g/ml de peptide HA en tampon de lavage). L'étape d'élution est également répétée une deuxième fois.

Révélation nitrate d'argent

Les extraits protéiques sont ensuite analysés par migration sur gel de polyacrylamide puis révélation au nitrate d'argent avec le kit SilverQuest[™] Silver Staining Kit selon le protocolel du fournisseur. Puis les extraits ont été analysés par spectrométrie de masse par la plateforme de protéomique de l'Institut Jacques Monod.

Co-immunoprécipitation des partenaires d'HBc

Les cellules sont lysées dans du tampon RIPA (10 mM Tris-Hcl pH8, 150 mM NaCl, 1 mM Na-EDTA pH8, 1% TritonX100, 0,1% SDS, 0,1% DOC) suplémenté par des inhibiteurs de protéase (Complete Roche) et de phosphatase (REF) pendant 30 min à 4°C. Les extraits sont ensuite soniqué 2 fois puis centrifigé à 13000 rpm pendant 20mintues. Pour les immunoprécipitations dans les cellules HelaS3, les extraits sont incubés pendant 2h avec des billes magnétiques couplées à un anticorps anti-HA (Pierce anti-HA magnetic beads – ThermoFisher) pendant 2h sur roue. Pour les immunoprécipations dans les cellules HepaD38, les extraits sont incubés avec 1ul d'anticorps anti-HBc (Dako B0586) sous agitation sur la nuit puis les billes magnétiques couplées aux protéine A/G (ChIP grade thermfisher) sont ajoutées aux extraits et incubés pendant 1h. Dans les deux cas les billes sont ensuite rincées 4 fois en tampon RIPA puis une fois en Tris Buffer Saline (TBS). Les extraits sont décrochés des billes par incubation pendant 10minutes dans du bleu laemmli 1X à 70°C.

Extinction de gènes par siARN et par sh ARN

Les expériences d'extinction de protéines par siARN sont réalisées grâce au transfectant Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) selon le protocole du fournisseur. Rapidement, les siARN sont diluées à une concentration de 10 µM de siRNA (cf. tableau annexe des siRNA) dans 200ul d'Opti-MEM (Gibco) et 6 ul de Lipofectamine (Invitrogen), le mélange est incubé 5 minutes à température ambiante puis ajouté au milieu de culture. Les cellules sont de nouveau transfectées 24h plus tard afin d'augmenter l'efficacité d'extinction de la protéine ciblée. Les échantillons sont récupérés à J7 post-transfection.

L'extinction des protéine Topol et Topoll a été réalisée par transduction des cellules HepG2NTCP par les lentivirus précédemment décrits pendant 16h puis les cellules sont récupérées 7 jours après transduction.

Protéine Ciblée	Référence anticorps	Dilution
НВс	Dako - B0856	1/32000 WB // 1/1000 IF
HBx	Abcam - ab39716	1/1000 WB
HBs	Abcam – ab859	1/4 IF
HA	Covence - MMS 101R	1/2000 WB // 1/500 IF
Tubuline	Sigma - T5168	1/10000 WB
USP3	Santa Cruz - sc135597	1/200 WB
SSRP1	Santa Cruz - sc-74536	1/200 WB
SPT16	Santa Cruz-sc-165987	1/200 WB
Topoisomerase I	Abcam – ab85038	1/1000 WB
Topoisomerase IIβ	BDbioscience - BD611492	1/1000 WB
Histone H1	Santa Cruz - sc-34464	1/1000 WB
Histone H2AX	Bethyl Laboratory - A300-082A-2	1/2000 WB
Histone H2B	Abcam – ab1790	1/2000 WB
lgG ChIP	Abcam – ab18413	

Tableau 1 : Anticorps

Cible	Amorce sens	Amorce antisens
Sonde Northern 1	5'-TAGCGCCTCATTTTGTGGGT	5'-CTTCCTGTCTGGCGATTGGT
Sonde Northern 2	5'-TAGGACCCCTGCTCGTGTTA	5'-CCGTCCGAAGGTTTGGTACA
Sonde Northern 3	5'-ATGTGGTATTGGGGGCCAAG	5'-GGTTGCGTCAGCAAACACTT
Sonde Northern 4	5'-TGGAACCTTTTCGGCTCCTC	5'-GGGAGTCCGCGTAAAGAGAG
Sonde Northern 5	5'-TACTGCACTCAGGCAAGCAA	5'-TGCGAATCCACACTCCGAAA
Sonde Northern 6	5'-AGACGAAGGTCTCAATCGCC	5'-ACCCACAAAATGAGGCGCTA
qPCR ADN RC	5'-GTTGCCCGTTTGTCCTCTAATTC	5'-GGAGGGATACATAGAGGTTCCTTG
qPCR ADNccc	5'-GTGCACTTCGCTTCACCTCT	5'-AGCTTGGAGGCTTGAACAGT
qPCR ARN totaux	5'-TGAACCTTTACCCCGTTGCC	5'-GTATGGATCGGCAGAGGAGC
qPCR ARNpg	5'-TGTCAACACTAATATGGGCCTAA	5'-AGGGGCATTTGGTGGTCTAT
qPCR ARN SP1	5'-CCGCGTCGCAGAAGATCT	5'-ATGGGAATACAGGTGCAATTTCC
qPCR SSRP1	5'-ATTCAACCCAGGTGAAGAGG	5'-GTTTCCGCTTCTTCTCATCC
qPCR SPT16h	5'-CGGGCAGCATTACTTACAGA	5'-TTCAGTCAATCGCCTCTTTG
qPCR Topo I	5'-AGGTCCCTGTTGAGAAACGA	5'-ACGGAATACCTTGGCTGTCA
qPCR Topo liβ	5'-AAGCACAAGAAAAGGCAGCA	5'-CTCGCCCTTTTGCATCTCTC
qPCR SRSF1	5'-TCCAGACATCCGAACCAA	5'-TACCCATCGTAATCATAGCC
qPCR Rhot2	5'-CTGCGGACTATCTCTCCCCTC	5'-AAAAGGCTTTGCAGCTCCAC
qPCR CyclinA2	5'-CCTGCTCAGTTTCCTTTGGT	5'-AGACGCCCAGAGATGCAG

Tableau 2 : amorces

Bibliographie

Abraham, T.M., and Loeb, D.D. (2007). The Topology of Hepatitis B Virus Pregenomic RNA Promotes Its Replication. J. Virol. *81*, 11577–11584.

Abraham, T.M., Lewellyn, E.B., Haines, K.M., and Loeb, D.D. (2008). Characterization of the contribution of spliced RNAs of hepatitis B virus to DNA synthesis in transfected cultures of Huh7 and HepG2 cells. Virology 379, 30–37.

Akiba, T., Nakayama, H., Miyazaki, Y., Kanno, A., Ishii, M., and Ohori, H. (1987). Relationship between the replication of hepatitis B virus and the localization of virus nucleocapsid antigen (HBcAg) in hepatocytes. J. Gen. Virol. *68 (Pt 3)*, 871–877.

Alarcon, V., Hernández, S., Rubio, L., Alvarez, F., Flores, Y., Varas-Godoy, M., De Ferrari, G.V., Kann, M., Villanueva, R.A., and Loyola, A. (2016). The enzymes LSD1 and Set1A cooperate with the viral protein HBx to establish an active hepatitis B viral chromatin state. Sci. Rep. *6*, 25901.

Albert, M., and Helin, K. (2010). Histone methyltransferases in cancer. Semin. Cell Dev. Biol. *21*, 209–220.

Alter, H.J., and Blumberg, B.S. (1966). Further Studies on a "New" Human Isoprecipitin System (Australia Antigen). Blood *27*, 297–309.

Aly, H.H., Suzuki, J., Watashi, K., Chayama, K., Hoshino, S., Hijikata, M., Kato, T., and Wakita, T. (2016). RNA Exosome Complex Regulates Stability of the Hepatitis B Virus X-mRNA Transcript in a Non-stop-mediated (NSD) RNA Quality Control Mechanism. J. Biol. Chem. *291*, 15958–15974.

Amaddeo, G., Cao, Q., Ladeiro, Y., Imbeaud, S., Nault, J.-C., Jaoui, D., Gaston Mathe, Y., Laurent, C., Laurent, A., Bioulac-Sage, P., et al. (2015). Integration of tumour and viral genomic characterisations in HBV-related hepatocellular carcinomas. Gut *64*, 820–829.

Anderson, K.E., Stevens, C.E., Tsuei, J.J., Lee, W.-C., Sun, S.-C., and Beasley, R.P. (1975). Hepatitis B Antigen in Infants Born to Mothers With Chronic Hepatitis B Antigenemia in Taiwan. Am. J. Dis. Child. *129*, 1389–1392.

Apostolou, E., and Thanos, D. (2008). Virus Infection Induces NF-kappaBdependent interchromosomal associations mediating monoallelic IFN-beta gene expression. Cell *134*, 85–96.

Artandi, S.E., and DePinho, R.A. (2010). Telomeres and telomerase in cancer. Carcinogenesis *31*, 9–18.

Aznarez, I., Nomakuchi, T.T., Tetenbaum-Novatt, J., Rahman, M.A., Fregoso, O., Rees, H., and Krainer, A.R. (2018). Mechanism of Nonsense-Mediated mRNA Decay Stimulation by Splicing Factor SRSF1. Cell Rep. *23*, 2186–2198.

Balistreri, G., Bognanni, C., and Mühlemann, O. (2017). Virus Escape and Manipulation of Cellular Nonsense-Mediated mRNA Decay. Viruses 9.

Barker, G.F., and Beemon, K. (1991). Nonsense codons within the Rous sarcoma virus gag gene decrease the stability of unspliced viral RNA. Mol. Cell. Biol. *11*, 2760–2768.

Barker, G.F., and Beemon, K. (1994). Rous sarcoma virus RNA stability requires an open reading frame in the gag gene and sequences downstream of the gag-pol junction. Mol. Cell. Biol. *14*, 1986–1996.

Bartenschlager, R., and Schaller, H. (1992). Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. EMBO J. *11*, 3413–3420.

Beasley, R.P., Hwang, L.-Y., Lin, C.-C., Leu, M.-L., Stevens, C.E., Szmuness, W., and Chen, K.-P. (1982). Incidence of Hepatitis B Virus Infections in Preschool Children in Taiwan. J. Infect. Dis. *146*, 198–204.

Belloni, L., Pollicino, T., De Nicola, F., Guerrieri, F., Raffa, G., Fanciulli, M., Raimondo, G., and Levrero, M. (2009). Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 19975–19979.

Belotserkovskaya, R., Oh, S., Bondarenko, V.A., Orphanides, G., Studitsky, V.M., and Reinberg, D. (2003). FACT Facilitates Transcription-Dependent Nucleosome Alteration. Science *301*, 1090–1093.

Benhenda, S., Cougot, D., Buendia, M.-A., and Neuveut, C. (2009). Chapter 4 Hepatitis B Virus X Protein: Molecular Functions and Its Role in Virus Life Cycle and Pathogenesis. In Advances in Cancer Research, (Academic Press), pp. 75–109.

Benn, J., and Schneider, R.J. (1995). Hepatitis B virus HBx protein deregulates cell cycle checkpoint controls. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *92*, 11215–11219.

Bertoletti, A., Maini, M., and Williams, R. (2003). Role of hepatitis B virus specific cytotoxic T cells in liver damage and viral control. Antiviral Res. *60*, 61–66.

Bhanja Chowdhury, J., Roy, D., and Ghosh, S. (2011). Identification of a unique splicing regulatory cluster in hepatitis B virus pregenomic RNA. FEBS Lett. *585*, 3348–3353.

Birch, J.L., Tan, B.C.-M., Panov, K.I., Panova, T.B., Andersen, J.S., Owen-Hughes, T.A., Russell, J., Lee, S.-C., and Zomerdijk, J.C.B.M. (2009). FACT facilitates chromatin transcription by RNA polymerases I and III. EMBO J. *28*, 854–865.

Blanchet, M., and Sureau, C. (2007). Infectivity Determinants of the Hepatitis B Virus Pre-S Domain Are Confined to the N-Terminal 75 Amino Acid Residues. J. Virol. *81*, 5841–5849.

Blumberg, B.S., Alter, H.J., and Visnich, S. (1965). A "NEW" ANTIGEN IN LEUKEMIA SERA. JAMA *191*, 541–546.

Bock, C.-T., Kubicka, S., Manns, M.P., and Trautwein, C. (1999). Two control elements in the hepatitis B virus S-promoter are important for full promoter activity mediated by CCAAT-binding factor. Hepatology 29, 1236–1247.

Bock, C.T., Schwinn, S., Locarnini, S., Fyfe, J., Manns, M.P., Trautwein, C., and Zentgraf, H. (2001). Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome11Edited by M. Yaniv. J. Mol. Biol. *307*, 183–196.

Bogomolski-Yahalom, V., Klein, A., Greenblat, I., Haviv, Y., and Tur-Kaspa, R. (1997). The TATA-less promoter of hepatitis B virus S gene contains a TBP binding site and an active initiator. Virus Res. *49*, 1–7.

Bontron, S. (2002). Hepatitis B Virus X Protein Associated with UV-DDB1 Induces Cell Death in the Nucleus and Is Functionally Antagonized by UV-DDB2. J. Biol. Chem. 277, 38847–38854.

Bouchard, M.J., Wang, L.H., and Schneider, R.J. (2001). Calcium signaling by HBx protein in hepatitis B virus DNA replication. Science *294*, 2376–2378.

Brechot, C., Pourcel, C., Louise, A., Rain, B., and Tiollais, P. (1980). Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. Nature *286*, 533–535.

Breugel, P.C. van, Robert, E.I., Mueller, H., Decorsière, A., Zoulim, F., Hantz, O., and Strubin, M. (2012). Hepatitis B virus X protein stimulates gene expression selectively from extrachromosomal DNA templates. Hepatology *56*, 2116–2124.

Brown, D.A., Di Cerbo, V., Feldmann, A., Ahn, J., Ito, S., Blackledge, N.P., Nakayama, M., McClellan, M., Dimitrova, E., Turberfield, A.H., et al. (2017). The SET1 Complex Selects Actively Transcribed Target Genes via Multivalent Interaction with CpG Island Chromatin. Cell Rep. *20*, 2313–2327.

Bruss, V., and Ganem, D. (1991). The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *88*, 1059–1063.

Buendia, M.-A., and Neuveut, C. (2015). Hepatocellular carcinoma. Cold Spring Harb. Perspect. Med. *5*, a021444.

Burns, G.S., and Thompson, A.J. (2014). Viral Hepatitis B: Clinical and Epidemiological Characteristics. Cold Spring Harb. Perspect. Med. *4*.

146

Candotti, D., and Allain, J.-P. (2017). Biological and clinical significance of hepatitis B virus RNA splicing: an update. Ann. Blood 2.

Chen, M., and Ou, J.H. (1995). Cell type-dependent regulation of the activity of the negative regulatory element of the hepatitis B virus core promoter. Virology *214*, 198–206.

Chen, C., Wu, M., Zhang, W., Lu, W., Zhang, M., Zhang, Z., Zhang, X., and Yuan, Z. (2016a). MicroRNA-939 restricts Hepatitis B virus by targeting Jmjd3-mediated and C/EBPα-coordinated chromatin remodeling. Sci. Rep. *6*.

Chen, C., Wang, J.C.-Y., Pierson, E.E., Keifer, D.Z., Delaleau, M., Gallucci, L., Cazenave, C., Kann, M., Jarrold, M.F., and Zlotnick, A. (2016b). Importin β Can Bind Hepatitis B Virus Core Protein and Empty Core-Like Particles and Induce Structural Changes. PLoS Pathog. *12*.

Chen, C.-J., Yang, H.-I., Su, J., Jen, C.-L., You, S.-L., Lu, S.-N., Huang, G.-T., Iloeje, U.H., and Group, for the R.-H.S. (2006). Risk of Hepatocellular Carcinoma Across a Biological Gradient of Serum Hepatitis B Virus DNA Level. JAMA *295*, 65–73.

Chen, J., Wu, M., Wang, F., Zhang, W., Wang, W., Zhang, X., Zhang, J., Liu, Y., Liu, Y., Feng, Y., et al. (2015). Hepatitis B virus spliced variants are associated with an impaired response to interferon therapy. Sci. Rep. *5*.

Chen, Y., Shen, A., Rider, P.J., Yu, Y., Wu, K., Mu, Y., Hao, Q., Liu, Y., Gong, H., Zhu, Y., et al. (2011). A liver-specific microRNA binds to a highly conserved RNA sequence of hepatitis B virus and negatively regulates viral gene expression and replication. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *25*, 4511–4521.

Chen, Y.-C., Chu, C.-M., and Liaw, Y.-F. (2010). Age-specific prognosis following spontaneous hepatitis B e antigen seroconversion in chronic hepatitis B. Hepatology *51*, 435–444.

Chi, B., Wang, K., Du, Y., Gui, B., Chang, X., Wang, L., Fan, J., Chen, S., Wu, X., Li, G., et al. (2014). A Sub-Element in PRE enhances nuclear export of intronless mRNAs by recruiting the TREX complex via ZC3H18. Nucleic Acids Res. *42*, 7305–7318.

Choi, B.H., Park, G.T., and Rho, H.M. (1999). Interaction of hepatitis B viral X protein and CCAAT/ enhancer-binding protein alpha synergistically activates the hepatitis B viral enhancer II/pregenomic promoter. J. Biol. Chem. *274*, 2858–2865.

Chong, C.K., Cheng, C.Y.S., Tsoi, S.Y.J., Huang, F.-Y., Liu, F., Seto, W.-K., Lai, C.-L., Yuen, M.-F., and Wong, D.K.-H. (2017). Role of hepatitis B core protein in HBV

transcription and recruitment of histone acetyltransferases to cccDNA minichromosome. Antiviral Res. *144*, 1–7.

Chu, C.-M., and Liaw, Y.-F. (1987). Intrahepatic distribution of hepatitis B surface and core antigens in chronic hepatitis B virus infection: Hepatocyte with cytoplasmic/membranous hepatitis B core antigen as a possible target for immune hepatocytolysis. Gastroenterology *92*, 220–225.

Chu, C.-M., Yeh, C.-T., Sheen, I.-S., and Liaw, Y.-F. (1995). Subcellular localization of hepatitis B core antigen in relation to hepatocyte regeneration in chronic hepatitis B. Gastroenterology *109*, 1926–1932.

Chu, C.M., Yeh, C.T., Chien, R.N., Sheen, I.S., and Liaw, Y.F. (1997). The degrees of hepatocyte nuclear but not cytoplasmic expression of hepatitis B core antigen reflect the level of viral replication in chronic hepatitis B virus infection. J. Clin. Microbiol. *35*, 102–105.

Chu, T.-H., Liou, A.-T., Su, P.-Y., Wu, H.-N., and Shih, C. (2014). Nucleic Acid Chaperone Activity Associated with the Arginine-Rich Domain of Human Hepatitis B Virus Core Protein. J. Virol. *88*, 2530–2543.

Chung, Y.-L., and Tsai, T.-Y. (2009). Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies Link the DNA Damage Repair Pathway with Hepatitis B Virus Replication: Implications for Hepatitis B Virus Exacerbation during Chemotherapy and Radiotherapy. Mol. Cancer Res. 7, 1672–1685.

Commerford, S.L., Carsten, A.L., and Cronkite, E.P. (1982). Histone turnover within nonproliferating cells. Proc. Natl. Acad. Sci. *79*, 1163–1165.

Cooper, A., and Shaul, Y. (2006). Clathrin-mediated endocytosis and lysosomal cleavage of hepatitis B virus capsid-like core particles. J. Biol. Chem. *281*, 16563–16569.

Cougot, D., Wu, Y., Cairo, S., Caramel, J., Renard, C.-A., Lévy, L., Buendia, M.A., and Neuveut, C. (2007). The Hepatitis B Virus X Protein Functionally Interacts with CREB-binding Protein/p300 in the Regulation of CREB-mediated Transcription. J. Biol. Chem. *282*, 4277–4287.

Crowther, R.A., Kiselev, N.A., Böttcher, B., Berriman, J.A., Borisova, G.P., Ose, V., and Pumpens, P. (1994). Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. Cell *77*, 943–950.

Dane, D.S., Cameron, C.H., and Briggs, M. (1970). VIRUS-LIKE PARTICLES IN SERUM OF PATIENTS WITH AUSTRALIA-ANTIGEN-ASSOCIATED HEPATITIS. The Lancet *295*, 695–698.

Daub, H., Blencke, S., Habenberger, P., Kurtenbach, A., Dennenmoser, J., Wissing, J., Ullrich, A., and Cotten, M. (2002). Identification of SRPK1 and SRPK2 as the major cellular protein kinases phosphorylating hepatitis B virus core protein. J. Virol. *76*, 8124–8137.

Decorsière, A., Mueller, H., van Breugel, P.C., Abdul, F., Gerossier, L., Beran, R.K., Livingston, C.M., Niu, C., Fletcher, S.P., Hantz, O., et al. (2016). Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor. Nature *531*, 386–389.

Deng, J.-J., Kong, K.-Y.E., Gao, W.-W., Tang, H.-M.V., Chaudhary, V., Cheng, Y., Zhou, J., Chan, C.-P., Wong, D.K.-H., Yuen, M.-F., et al. (2017). Interplay between SIRT1 and hepatitis B virus X protein in the activation of viral transcription. Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech. *1860*, 491–501.

Deng, L., Gan, X., Ito, M., Chen, M., Aly, H.H., Matsui, C., Abe, T., Watashi, K., Wakita, T., Suzuki, T., et al. (2019). Peroxiredoxin 1, a Novel HBx-Interacting Protein, Interacts with Exosome Component 5 and Negatively Regulates Hepatitis B Virus (HBV) Propagation through Degradation of HBV RNA. J. Virol. *93*, e02203-18.

Deroubaix, A., Osseman, Q., Cassany, A., Bégu, D., Ragues, J., Kassab, S., Lainé, S., and Kann, M. (2015). Expression of viral polymerase and phosphorylation of core protein determine core and capsid localization of the human hepatitis B virus. J. Gen. Virol. *96*, 183–195.

Diab, A., Foca, A., Fusil, F., Lahlali, T., Jalaguier, P., Amirache, F., N'Guyen, L., Isorce, N., Cosset, F.-L., Zoulim, F., et al. (2017). Polo-like-kinase 1 is a proviral host factor for hepatitis B virus replication. Hepatology *66*, 1750–1765.

Ding, D., Lou, X., Hua, D., Yu, W., Li, L., Wang, J., Gao, F., Zhao, N., Ren, G., Li, L., et al. (2012). Recurrent Targeted Genes of Hepatitis B Virus in the Liver Cancer Genomes Identified by a Next-Generation Sequencing–Based Approach. PLoS Genet. *8*.

Doitsh, G., and Shaul, Y. (2004). Enhancer I predominance in hepatitis B virus gene expression. Mol. Cell. Biol. *24*, 1799–1808.

Donello, J.E., Beeche, A.A., Smith, G.J., Lucero, G.R., and Hope, T.J. (1996). The hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element is composed of two subelements. J. Virol. *70*, 4345–4351.

Donello, J.E., Loeb, J.E., and Hope, T.J. (1998). Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. J. Virol. *72*, 5085–5092.

Du, M., and Bai, L. (2017). 3D clustering of co-regulated genes and its effect on gene expression. Curr. Genet. 63, 1017–1021.

149

Du, J., Liang, X., Liu, Y., Qu, Z., Gao, L., Han, L., Liu, S., Cui, M., Shi, Y., Zhang, Z., et al. (2009). Hepatitis B virus core protein inhibits TRAIL-induced apoptosis of hepatocytes by blocking DR5 expression. Cell Death Differ. *16*, 219–229.

Duriez, M., Mandouri, Y., Lekbaby, B., Wang, H., Schnuriger, A., Redelsperger, F., Guerrera, C.I., Lefevre, M., Fauveau, V., Ahodantin, J., et al. (2017). Alternative splicing of hepatitis B virus: A novel virus/host interaction altering liver immunity. J. Hepatol.

Dusheiko, G. (2013). Treatment of HBeAg positive chronic hepatitis B: interferon or nucleoside analogues. Liver Int. *33*, 137–150.

Ehlers, I., Horke, S., Reumann, K., Rang, A., Grosse, F., Will, H., and Heise, T. (2004). Functional characterization of the interaction between human La and hepatitis B virus RNA. J. Biol. Chem. *279*, 43437–43447.

Fanucchi, S., Shibayama, Y., Burd, S., Weinberg, M.S., and Mhlanga, M.M. (2013). Chromosomal contact permits transcription between coregulated genes. Cell *155*, 606–620.

Ferber, M.J., Montoya, D.P., Yu, C., Aderca, I., McGee, A., Thorland, E.C., Nagorney, D.M., Gostout, B.S., Burgart, L.J., Boix, L., et al. (2003). Integrations of the hepatitis B virus (HBV) and human papillomavirus (HPV) into the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene in liver and cervical cancers. Oncogene *22*, 3813.

Flecken, T., Meier, M.-A., Skewes-Cox, P., Barkan, D.T., Heim, M.H., Wieland, S.F., and Holdorf, M.M. (2019). Mapping the Heterogeneity of Histone Modifications on Hepatitis B Virus DNA Using Liver Needle Biopsies Obtained from Chronically Infected Patients. J. Virol. *93*, e02036-18.

Freeman, G. (1946). Epidemiology and incubation period of jaundice following yellow fever vaccination. Am. J. Trop. Med. Hyg. *26*, 15–32.

Fung, S.K., and Lok, A.S.F. (2004). Hepatitis B virus genotypes: Do they play a role in the outcome of HBV infection? Hepatology *40*, 790–792.

Galibert, F., Mandart, E., Fitoussi, F., Tiollais, P., and Charnay, P. (1979). Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in E. coli. Nature *281*, 646–650.

Gallucci, L., and Kann, M. (2017). Nuclear Import of Hepatitis B Virus Capsids and Genome. Viruses 9.

Garcia, A.D., Ostapchuk, P., and Hearing, P. (1993). Functional interaction of nuclear factors EF-C, HNF-4, and RXR alpha with hepatitis B virus enhancer I. J. Virol. *67*, 3940–3950.

150

Gavilanes, F., Gonzalez-Ros, J.M., and Peterson, D.L. (1982). Structure of hepatitis B surface antigen. Characterization of the lipid components and their association with the viral proteins. J. Biol. Chem. *257*, 7770–7777.

Ge, Z., Quek, B.L., Beemon, K.L., and Hogg, J.R. Polypyrimidine tract binding protein 1 protects mRNAs from recognition by the nonsense-mediated mRNA decay pathway. ELife *5*.

Gilbert, S., Galarneau, L., Lamontagne, A., Roy, S., and Bélanger, L. (2000). The hepatitis B virus core promoter is strongly activated by the liver nuclear receptor fetoprotein transcription factor or by ectopically expressed steroidogenic factor 1. J. Virol. 74, 5032–5039.

Gómez-Moreno, A., and Garaigorta, U. (2017). Hepatitis B Virus and DNA Damage Response: Interactions and Consequences for the Infection. Viruses 9.

Gripon, P., Cannie, I., and Urban, S. (2005). Efficient Inhibition of Hepatitis B Virus Infection by Acylated Peptides Derived from the Large Viral Surface Protein. J. Virol. *79*, 1613–1622.

Guidotti, L.G., Martinez, V., Loh, Y.T., Rogler, C.E., and Chisari, F.V. (1994). Hepatitis B virus nucleocapsid particles do not cross the hepatocyte nuclear membrane in transgenic mice. J. Virol. *68*, 5469–5475.

Guidotti, L.G., Ishikawa, T., Hobbs, M.V., Matzke, B., Schreiber, R., and Chisari, F.V. (1996). Intracellular Inactivation of the Hepatitis B Virus by Cytotoxic T Lymphocytes. Immunity *4*, 25–36.

Günther, S., Sommer, G., Iwanska, A., and Will, H. (1997). Heterogeneity and Common Features of Defective Hepatitis B Virus Genomes Derived from Spliced Pregenomic RNA. Virology *238*, 363–371.

Guo, Y., Kang, W., Lei, X., Li, Y., Xiang, A., Liu, Y., Zhao, J., Zhang, J., and Yan, Z. (2012). Hepatitis B viral core protein disrupts human host gene expression by binding to promoter regions. BMC Genomics *13*, 563.

Guo, Y.-H., Li, Y.-N., Zhao, J.-R., Zhang, J., and Yan, Z. (2011). HBc binds to the CpG islands of HBV cccDNA and promotes an epigenetic permissive state. Epigenetics *6*, 720–726.

Gushchanskaya, E.S., Artemov, A.V., Ulyanov, S.V., Logacheva, M.D., Penin, A.A., Kotova, E.S., Akopov, S.B., Nikolaev, L.G., Iarovaia, O.V., Sverdlov, E.D., et al. (2014). The clustering of CpG islands may constitute an important determinant of the 3D organization of interphase chromosomes. Epigenetics *9*, 951–963.

Halgand, B., Desterke, C., Rivière, L., Fallot, G., Sebagh, M., Calderaro, J., Bioulac-Sage, P., Neuveut, C., Buendia, M.-A., Samuel, D., et al. (2018). Hepatitis B Virus Pregenomic RNA in Hepatocellular Carcinoma: A Nosological and Prognostic Determinant. Hepatology *67*, 86–96.

Hass, M., Hannoun, C., Kalinina, T., Sommer, G., Manegold, C., and Günther, S. (2005). Functional analysis of hepatitis B virus reactivating in hepatitis B surface antigen-negative individuals. Hepatol. Baltim. Md *42*, 93–103.

Heermann, K.H., Goldmann, U., Schwartz, W., Seyffarth, T., Baumgarten, H., and Gerlich, W.H. (1984). Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. J. Virol. *52*, 396–402.

Heger-Stevic, J., Zimmermann, P., Lecoq, L., Böttcher, B., and Nassal, M. (2018). Hepatitis B virus core protein phosphorylation: Identification of the SRPK1 target sites and impact of their occupancy on RNA binding and capsid structure. PLoS Pathog. *14*.

Heise, T., Guidotti, L.G., and Chisari, F.V. (1999). La Autoantigen Specifically Recognizes a Predicted Stem-Loop in Hepatitis B Virus RNA. J. Virol. *73*, 5767–5776.

Heise, T., Guidotti, L.G., and Chisari, F.V. (2001). Characterization of nuclear RNases that cleave hepatitis B virus RNA near the La protein binding site. J. Virol. *75*, 6874–6883.

Heise, T., Sommer, G., Reumann, K., Meyer, I., Will, H., and Schaal, H. (2006). The hepatitis B virus PRE contains a splicing regulatory element. Nucleic Acids Res. *34*, 353–363.

Henkler, F., Hoare, J., Waseem, N., Goldin, R.D., McGarvey, M.J., Koshy, R., and King, I.A. (2001). Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein. J. Gen. Virol. *82*, 871–882.

Heo, K., Kim, H., Choi, S.H., Choi, J., Kim, K., Gu, J., Lieber, M.R., Yang, A.S., and An, W. (2008). FACT-mediated exchange of histone variant H2AX regulated by phosphorylation of H2AX and ADP-ribosylation of Spt16. Mol. Cell *30*, 86–97.

Hoare, J., Henkler, F., Dowling, J.J., Errington, W., Goldin, R.D., Fish, D., and McGarvey, M.J. (2001). Subcellular localisation of the X protein in HBV infected hepatocytes. J. Med. Virol. *64*, 419–426.

Hodgson, A.J., Hyser, J.M., Keasler, V.V., Cang, Y., and Slagle, B.L. (2012). Hepatitis B virus regulatory HBx protein binding to DDB1 is required but is not sufficient for maximal HBV replication. Virology *426*, 73–82.

Hong, X., Kim, E.S., and Guo, H. (2017). Epigenetic Regulation of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA: Implications for Epigenetic Therapy against Chronic Hepatitis B. Hepatol. Baltim. Md *66*, 2066–2077.

Hsu, Y.-S., Chien, R.-N., Yeh, C.-T., Sheen, I.-S., Chiou, H.-Y., Chu, C.-M., and Liaw, Y.-F. (2002). Long-term outcome after spontaneous HBeAg seroconversion in patients with chronic hepatitis B. Hepatology *35*, 1522–1527.

Huang, J., and Liang, T.J. (1993). A novel hepatitis B virus (HBV) genetic element with Rev response element-like properties that is essential for expression of HBV gene products. Mol. Cell. Biol. *13*, 7476–7486.

Huang, K.-Y., and Lin, S.-R. (2000). Nationwide vaccination: A success story in Taiwan. Vaccine *18*, S35–S38.

Huang, Z.M., and Yen, T.S. (1994). Hepatitis B virus RNA element that facilitates accumulation of surface gene transcripts in the cytoplasm. J. Virol. *68*, 3193–3199.

Huang, C., Xie, M.-H., Liu, W., Yang, B., Yang, F., Huang, J., Huang, J., Wu, Q., Fu, X.-D., and Zhang, Y. (2011). A structured RNA in hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element represses alternative splicing in a sequenceindependent and position-dependent manner. FEBS J. *278*, 1533–1546.

Huang, H., Santoso, N., Power, D., Simpson, S., Dieringer, M., Miao, H., Gurova, K., Giam, C.-Z., Elledge, S.J., and Zhu, J. (2015). FACT Proteins, SUPT16H and SSRP1, Are Transcriptional Suppressors of HIV-1 and HTLV-1 That Facilitate Viral Latency. J. Biol. Chem. *290*, 27297–27310.

Huang, H.-C., Chen, C.-C., Chang, W.-C., Tao, M.-H., and Huang, C. (2012). Entry of Hepatitis B Virus into Immortalized Human Primary Hepatocytes by Clathrin-Dependent Endocytosis. J. Virol. *86*, 9443–9453.

Huang, H.-C., Tao, M.-H., Hung, T.-M., Chen, J.-C., Lin, Z.-J., and Huang, C. (2014). (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits entry of hepatitis B virus into hepatocytes. Antiviral Res. *111*, 100–111.

Huang, H.-L., Jeng, K.-S., Hu, C.-P., Tsai, C.-H., Lo, S.J., and Chang, C. (2000). Identification and Characterization of a Structural Protein of Hepatitis B Virus: A Polymerase and Surface Fusion Protein Encoded by a Spliced RNA. Virology *275*, 398–410.

Ito, N., Nakashima, K., Sun, S., Ito, M., and Suzuki, T. (2019). Cell Type Diversity in Hepatitis B Virus RNA Splicing and Its Regulation. Front. Microbiol. *10*.

Jain, S., Chang, T.-T., Chen, S., Boldbaatar, B., Clemens, A., Lin, S.Y., Yan, R., Hu, C.-T., Guo, H., Block, T.M., et al. (2015). Comprehensive DNA methylation analysis of hepatitis B virus genome in infected liver tissues. Sci. Rep. *5*, 10478.

Jamai, A., Puglisi, A., and Strubin, M. (2009). Histone Chaperone Spt16 Promotes Redeposition of the Original H3-H4 Histones Evicted by Elongating RNA Polymerase. Mol. Cell *35*, 377–383.

Jeong, H., Cho, M.-H., Park, S.-G., and Jung, G. (2014). Interaction between nucleophosmin and HBV core protein increases HBV capsid assembly. FEBS Lett. *588*, 851–858.

Jiang, Z., Jhunjhunwala, S., Liu, J., Haverty, P.M., Kennemer, M.I., Guan, Y., Lee, W., Carnevali, P., Stinson, J., Johnson, S., et al. (2012). The effects of hepatitis B virus integration into the genomes of hepatocellular carcinoma patients. Genome Res. *22*, 593–601.

Jones, S.A., Boregowda, R., Spratt, T.E., and Hu, J. (2012). In vitro epsilon RNAdependent protein priming activity of human hepatitis B virus polymerase. J. Virol. *86*, 5134–5150.

Jung, J., Hwang, S.G., Chwae, Y.-J., Park, S., Shin, H.-J., and Kim, K. (2014). Phosphoacceptors threonine 162 and serines 170 and 178 within the carboxyl-terminal RRRS/T motif of the hepatitis B virus core protein make multiple contributions to hepatitis B virus replication. J. Virol. *88*, 8754–8767.

Jung, Y.J., Kim, J.-W., Park, S.J., Min, B.Y., Jang, E.S., Kim, N.Y., Jeong, S.-H., Shin, C.M., Lee, S.H., Park, Y.S., et al. (2013). c-Myc-mediated overexpression of miR-17-92 suppresses replication of hepatitis B virus in human hepatoma cells. J. Med. Virol. *85*, 969–978.

Kalashnikova, A.A., Winkler, D.D., McBryant, S.J., Henderson, R.K., Herman, J.A., DeLuca, J.G., Luger, K., Prenni, J.E., and Hansen, J.C. (2013). Linker histone H1.0 interacts with an extensive network of proteins found in the nucleolus. Nucleic Acids Res. *41*, 4026–4035.

Kalashnikova, A.A., Rogge, R.A., and Hansen, J.C. (2016). Linker histone H1 and protein-protein interactions. Biochim. Biophys. Acta *1859*, 455–461.

Kann, M., and Gerlich, W.H. (1994). Effect of core protein phosphorylation by protein kinase C on encapsidation of RNA within core particles of hepatitis B virus. J. Virol. *68*, 7993–8000.

Kaplan, C.D., Laprade, L., and Winston, F. (2003). Transcription elongation factors repress transcription initiation from cryptic sites. Science *301*, 1096–1099.

Kaplan, P.M., Ford, E.C., Purcell, R.H., and Gerin, J.L. (1976). Demonstration of subpopulations of Dane particles. J. Virol. *17*, 885–893.

Kaur, P., Paliwal, A., Durantel, D., Hainaut, P., Scoazec, J.-Y., Zoulim, F., Chemin, I., and Herceg, Z. (2010). DNA methylation of hepatitis B virus (HBV) genome associated with the development of hepatocellular carcinoma and occult HBV infection. J. Infect. Dis. *202*, 700–704.

Keasler, V.V., Hodgson, A.J., Madden, C.R., and Slagle, B.L. (2007). Enhancement of hepatitis B virus replication by the regulatory X protein in vitro and in vivo. J. Virol. *81*, 2656–2662.

Keasler, V.V., Hodgson, A.J., Madden, C.R., and Slagle, B.L. (2009). Hepatitis B virus HBx protein localized to the nucleus restores HBx-deficient virus replication in HepG2 cells and in vivo in hydrodynamically-injected mice. Virology *390*, 122–129.

Kilchert, C., Wittmann, S., and Vasiljeva, L. (2016). The regulation and functions of the nuclear RNA exosome complex. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *17*, 227–239.

Kim, B.K., Lim, S.O., and Park, Y.G. (2008). Requirement of the cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein for hepatitis B virus replication. Hepatology *48*, 361–373.

Kim, C.M., Koike, K., Saito, I., Miyamura, T., and Jay, G. (1991). HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. Nature *351*, 317–320.

Kimbi, G.C., Kramvis, A., and Kew, M.C. (2005). Integration of hepatitis B virus DNA into chromosomal DNA during acute hepatitis B. World J. Gastroenterol. WJG *11*, 6416–6421.

Kitamura, K., Que, L., Shimadu, M., Koura, M., Ishihara, Y., Wakae, K., Nakamura, T., Watashi, K., Wakita, T., and Muramatsu, M. (2018). Flap endonuclease 1 is involved in cccDNA formation in the hepatitis B virus. PLoS Pathog. *14*.

Knaus, T., and Nassal, M. (1993). The encapsidation signal on the hepatitis B virus RNA pregenome forms a stem-loop structure that is critical for its function. Nucleic Acids Res. *21*, 3967–3975.

Kohno, T., Tsuge, M., Murakami, E., Hiraga, N., Abe, H., Miki, D., Imamura, M., Ochi, H., Hayes, C.N., and Chayama, K. (2014). Human microRNA hsa-miR-1231 suppresses hepatitis B virus replication by targeting core mRNA. J. Viral Hepat. *21*, e89-97.

Koike, K., Moriya, K., Yotsuyanagi, H., Iino, S., and Kurokawa, K. (1994). Induction of cell cycle progression by hepatitis B virus HBx gene expression in quiescent mouse fibroblasts. J. Clin. Invest. *94*, 44–49. Königer, C., Wingert, I., Marsmann, M., Rösler, C., Beck, J., and Nassal, M. (2014). Involvement of the host DNA-repair enzyme TDP2 in formation of the covalently closed circular DNA persistence reservoir of hepatitis B viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *111*, E4244–E4253.

Kouwaki, T., Okamoto, T., Ito, A., Sugiyama, Y., Yamashita, K., Suzuki, T., Kusakabe, S., Hirano, J., Fukuhara, T., Yamashita, A., et al. (2016). Hepatocyte Factor JMJD5 Regulates Hepatitis B Virus Replication through Interaction with HBx. J. Virol. *90*, 3530–3542.

Kwon, J.A., and Rho, H.M. (2002). Hepatitis B viral core protein activates the hepatitis B viral enhancer II/pregenomic promoter through the nuclear factor kappaB binding site. Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell. *80*, 445–455.

Lai, C.-L., Dienstag, J., Schiff, E., Leung, N.W.Y., Atkins, M., Hunt, C., Brown, N., Woessner, M., Boehme, R., and Condreay, L. (2003). Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. *36*, 687–696.

Lai, M.-C., Peng, T.-Y., and Tarn, W.-Y. (2009). Functional interplay between viral and cellular SR proteins in control of post-transcriptional gene regulation. FEBS J. 276, 1517–1526.

Lambert, C., Döring, T., and Prange, R. (2007). Hepatitis B Virus Maturation Is Sensitive to Functional Inhibition of ESCRT-III, Vps4, and γ2-Adaptin. J. Virol. *81*, 9050–9060.

Lan, Y.T., Li, J., Liao, W., and Ou, J. (1999). Roles of the Three Major Phosphorylation Sites of Hepatitis B Virus Core Protein in Viral Replication. Virology *259*, 342–348.

Lavanchy, D. (2004). Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. J. Viral Hepat. *11*, 97–107.

Lee, S.J., Shim, H.Y., Hsieh, A., Min, J.Y., and Jung, G. hung (2009). Hepatitis B virus core interacts with the host cell nucleolar protein, nucleophosmin 1. J. Microbiol. Seoul Korea *47*, 746–752.

Leupin, O., Bontron, S., Schaeffer, C., and Strubin, M. (2005). Hepatitis B virus X protein stimulates viral genome replication via a DDB1-dependent pathway distinct from that leading to cell death. J. Virol. *79*, 4238–4245.

Levitt, N., Briggs, D., Gil, A., and Proudfoot, N.J. (1989). Definition of an efficient synthetic poly(A) site. Genes Dev. *3*, 1019–1025.

Lewellyn, E.B., and Loeb, D.D. (2011). The Arginine Clusters of the Carboxy-Terminal Domain of the Core Protein of Hepatitis B Virus Make Pleiotropic Contributions to Genome Replication. J. Virol. *85*, 1298–1309.

Li, J., and Ou, J. (2001). Differential Regulation of Hepatitis B Virus Gene Expression by the Sp1 Transcription Factor. J. Virol. *75*, 8400–8406.

Li, G., Ruan, X., Auerbach, R.K., Sandhu, K.S., Zheng, M., Wang, P., Poh, H.M., Goh, Y., Lim, J., Zhang, J., et al. (2012). Extensive promoter-centered chromatin interactions provide a topological basis for transcription regulation. Cell *148*, 84–98.

Li, H.-C., Huang, E.-Y., Su, P.-Y., Wu, S.-Y., Yang, C.-C., Lin, Y.-S., Chang, W.-C., and Shih, C. (2010). Nuclear Export and Import of Human Hepatitis B Virus Capsid Protein and Particles. PLoS Pathog. *6*.

Li, M., Xie, Y., Wu, X., Kong, Y., and Wang, Y. (1995). HNF3 Binds and Activates the Second Enhancer, ENII, of Hepatitis B Virus. Virology *214*, 371–378.

Li, M., Sohn, J.A., and Seeger, C. (2018). Distribution of Hepatitis B Virus Nuclear DNA. J. Virol. 92.

Li, T., Ke, Z., Liu, W., Xiong, Y., Zhu, Y., and Liu, Y. (2019). Human Hepatitis B Virus Core Protein Inhibits IFNα-Induced IFITM1 Expression by Interacting with BAF200. Viruses *11*, 427.

Liang, G., Liu, G., Kitamura, K., Wang, Z., Chowdhury, S., Monjurul, A.M., Wakae, K., Koura, M., Shimadu, M., Kinoshita, K., et al. (2015). TGF- β Suppression of HBV RNA through AID-Dependent Recruitment of an RNA Exosome Complex. PLoS Pathog. *11*.

Liao, W., and Ou, J.H. (1995). Phosphorylation and nuclear localization of the hepatitis B virus core protein: significance of serine in the three repeated SPRRR motifs. J. Virol. *69*, 1025–1029.

Liaw, Y.-F., and Chu, C.-M. (2009). Hepatitis B virus infection. The Lancet *373*, 582–592.

Lin, W.-J., Li, J., Lee, Y.-F., Yeh, S.-D., Altuwaijri, S., Ou, J.-H., and Chang, C. (2003). Suppression of hepatitis B virus core promoter by the nuclear orphan receptor TR4. J. Biol. Chem. 278, 9353–9360.

Link, T., and Iwakuma, T. (2017). Roles of p53 in extrinsic factor-induced liver carcinogenesis. Hepatoma Res. *3*, 95–104.

Liu, C.-J., Jeng, Y.-M., Chen, C.-L., Cheng, H.-R., Chen, P.-J., Chen, T.-C., Liu, C.-H., Lai, M.-Y., Chen, D.-S., and Kao, J.-H. (2009). Hepatitis B Virus Basal Core

Promoter Mutation and DNA Load Correlate with Expression of Hepatitis B Core Antigen in Patients with Chronic Hepatitis B. J. Infect. Dis. *199*, 742–749.

Liu, K., Luckenbaugh, L., Ning, X., Xi, J., and Hu, J. (2018a). Multiple roles of core protein linker in hepatitis B virus replication. PLOS Pathog. *14*, e1007085.

Liu, Q., Somiya, M., Shimada, N., Sakamoto, W., Yoshimoto, N., Iijima, M., Tatematsu, K., Nakai, T., Okajima, T., Maruyama, A., et al. (2016a). Mutational analysis of hepatitis B virus pre-S1 (9–24) fusogenic peptide. Biochem. Biophys. Res. Commun. *474*, 406–412.

Liu, Q., Somiya, M., Iijima, M., Tatematsu, K., and Kuroda, S. (2018b). A hepatitis B virus-derived human hepatic cell-specific heparin-binding peptide: identification and application to a drug delivery system. Biomater. Sci. *7*, 322–335.

Liu, S., Koh, S.S.Y., and Lee, C.G.L. (2016b). Hepatitis B Virus X Protein and Hepatocarcinogenesis. Int. J. Mol. Sci. *17*.

Livingston, C., Ramakrishnan, D., Strubin, M., Fletcher, S., Beran, R., Livingston, C.M., Ramakrishnan, D., Strubin, M., Fletcher, S.P., and Beran, R.K. (2017). Identifying and Characterizing Interplay between Hepatitis B Virus X Protein and Smc5/6. Viruses *9*, 69.

Long, Q., Yan, R., Hu, J., Cai, D., Mitra, B., Kim, E.S., Marchetti, A., Zhang, H., Wang, S., Liu, Y., et al. (2017). The role of host DNA ligases in hepadnavirus covalently closed circular DNA formation. PLoS Pathog. *13*.

Lopez, A.P., Kugelman, J.R., Garcia-Rivera, J., Urias, E., Salinas, S.A., Fernandez-Zapico, M.E., and Llano, M. (2016). The Structure Specific Recognition Protein 1 associates with Lens Epithelium-Derived Growth Factor proteins and modulates HIV-1 replication. J. Mol. Biol. *428*, 2814–2831.

López-Cabrera, M., Letovsky, J., Hu, K.Q., and Siddiqui, A. (1990). Multiple liverspecific factors bind to the hepatitis B virus core/pregenomic promoter: trans-activation and repression by CCAAT/enhancer binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *87*, 5069–5073.

López-Cabrera, M., Letovsky, J., Hu, K.-Q., and Siddiqui, A. (1991). Transcriptional factor C/EBP binds to and transactivates the enhancer element II of the hepatitis B virus. Virology *183*, 825–829.

Lucifora, J., Arzberger, S., Durantel, D., Belloni, L., Strubin, M., Levrero, M., Zoulim, F., Hantz, O., and Protzer, U. (2011). Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. J. Hepatol. *55*, 996–1003.

Ludgate, L., Ning, X., Nguyen, D.H., Adams, C., Mentzer, L., and Hu, J. (2012). Cyclin-Dependent Kinase 2 Phosphorylates S/T-P Sites in the Hepadnavirus Core Protein C-Terminal Domain and Is Incorporated into Viral Capsids. J. Virol. *86*, 12237– 12250.

Ma, Z.-M., Lin, X., Wang, Y.-X., Tian, X.-C., Xie, Y.-H., and Wen, Y.-M. (2009). A double-spliced defective hepatitis B virus genome derived from hepatocellular carcinoma tissue enhanced replication of full-length virus. J. Med. Virol. *81*, 230–237.

Mabit, H., Knaust, A., Breiner, K.M., and Schaller, H. (2003). Nuclear Localization of the Duck Hepatitis B Virus Capsid Protein: Detection and Functional Implications of Distinct Subnuclear Bodies in a Compartment Associated with RNA Synthesis and Maturation. J. Virol. 77, 2157–2164.

Maguire, H.F., Hoeffler, J.P., and Siddiqui, A. (1991). HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions. Science *252*, 842–844.

Maini, M.K., and Gehring, A.J. (2016). The role of innate immunity in the immunopathology and treatment of HBV infection. J. Hepatol. *64*, S60–S70.

Makokha, G.N., Abe-Chayama, H., Chowdhury, S., Hayes, C.N., Tsuge, M., Yoshima, T., Ishida, Y., Zhang, Y., Uchida, T., Tateno, C., et al. (2019). Regulation of the Hepatitis B virus replication and gene expression by the multi-functional protein TARDBP. Sci. Rep. 9, 8462.

Makvandi, M. (2016). Update on occult hepatitis B virus infection. World J. Gastroenterol. 22, 8720–8734.

Malim, M.H., Hauber, J., Le, S.-Y., Maizel, J.V., and Cullen, B.R. (1989). The HIV-1 rev trans -activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. Nature *338*, 254.

Maquat, L.E. (2004). Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *5*, 89.

Mason, P.B., and Struhl, K. (2004). The FACT Complex Travels with Elongating RNA Polymerase II and Is Important for the Fidelity of Transcriptional Initiation In Vivo. Mol. Cell. Biol. *24*, 6536.

Mason, W.S., Gill, U.S., Litwin, S., Zhou, Y., Peri, S., Pop, O., Hong, M.L.W., Naik, S., Quaglia, A., Bertoletti, A., et al. (2016). HBV DNA Integration and Clonal Hepatocyte Expansion in Chronic Hepatitis B Patients Considered Immune Tolerant. Gastroenterology *151*, 986-998.e4.

159

Matysiak, J., Lesbats, P., Mauro, E., Lapaillerie, D., Dupuy, J.-W., Lopez, A.P., Benleulmi, M.S., Calmels, C., Andreola, M.-L., Ruff, M., et al. (2017). Modulation of chromatin structure by the FACT histone chaperone complex regulates HIV-1 integration. Retrovirology *14*, 39.

Maupas, P., Coursaget, P., Goudeau, A., Drucker, J., and Bagros, P. (1976). IMMUNISATION AGAINST HEPATITIS B IN MAN. The Lancet *307*, 1367–1370.

Melegari, M., Wolf, S.K., and Schneider, R.J. (2005). Hepatitis B Virus DNA Replication Is Coordinated by Core Protein Serine Phosphorylation and HBx Expression. J. Virol. 79, 9810–9820.

Michalak, T., and Nowosławski, A. (1982). Crystalline aggregates of hepatitis B core particles in cytoplasm of hepatocytes. Intervirology *17*, 247–252.

Milich, D.R., Thornton, G.B., Neurath, A.R., Kent, S.B., Michel, M.L., Tiollais, P., and Chisari, F.V. (1985). Enhanced immunogenicity of the pre-S region of hepatitis B surface antigen. Science *228*, 1195–1199.

Milich, D.R., Chen, M.K., Hughes, J.L., and Jones, J.E. (1998). The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: a mechanism for persistence. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *160*, 2013–2021.

Miura, N., Horikawa, I., Nishimoto, A., Ohmura, H., Ito, H., Hirohashi, S., Shay, J.W., and Oshimura, M. (1997). Progressive telomere shortening and telomerase reactivation during hepatocellular carcinogenesis. Cancer Genet. Cytogenet. *93*, 56–62.

Moolla, N., Kew, M., and Arbuthnot, P. (2002). Regulatory elements of hepatitis B virus transcription. J. Viral Hepat. *9*, 323–331.

Moon, I.Y., Choi, J.H., Chung, J.W., Jang, E.S., Jeong, S.-H., and Kim, J.-W. (2019). MicroRNA-20 induces methylation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in human hepatoma cells. Mol. Med. Rep.

Moreau, P., Cournac, A., Palumbo, G.A., Marbouty, M., Mortaza, S., Thierry, A., Cairo, S., Lavigne, M., Koszul, R., and Neuveut, C. (2018). Tridimensional infiltration of DNA viruses into the host genome shows preferential contact with active chromatin. Nat. Commun. 9, 4268.

Mühlemann, B., Jones, T.C., Damgaard, P. de B., Allentoft, M.E., Shevnina, I., Logvin, A., Usmanova, E., Panyushkina, I.P., Boldgiv, B., Bazartseren, T., et al. (2018). Ancient hepatitis B viruses from the Bronze Age to the Medieval period. Nature *557*, 418.

160

Murakami, S., Cheong, J.H., and Kaneko, S. (1994). Human hepatitis virus X gene encodes a regulatory domain that represses transactivation of X protein. J. Biol. Chem. *269*, 15118–15123.

Mure, F., Corbin, A., Benbahouche, N.E.H., Bertrand, E., Manet, E., and Gruffat, H. (2018). The splicing factor SRSF3 is functionally connected to the nuclear RNA exosome for intronless mRNA decay. Sci. Rep. *8*.

Mylonas, C., and Tessarz, P. (2018). Transcriptional repression by FACT is linked to regulation of chromatin accessibility at the promoter of ES cells. Life Sci. Alliance *1*.

Nakatani, Y., and Ogryzko, V. (2003). Immunoaffinity Purification of Mammalian Protein Complexes. In Methods in Enzymology, (Academic Press), pp. 430–444.

Nielsen, M., Ard, R., Leng, X., Ivanov, M., Kindgren, P., Pelechano, V., and Marquardt, S. (2019). Transcription-driven Chromatin repression of Intragenic transcription start sites. PLOS Genet. *15*, e1007969.

Ning, B., and Shih, C. (2004). Nucleolar localization of human hepatitis B virus capsid protein. J. Virol. *78*, 13653–13668.

Nunes, N.M., Li, W., Tian, B., and Furger, A. (2010). A functional human Poly(A) site requires only a potent DSE and an A-rich upstream sequence. EMBO J. *29*, 1523–1536.

Ong, C.-T., and Corces, V.G. (2014). CTCF: An Architectural Protein Bridging Genome Topology and Function. Nat. Rev. Genet. *15*, 234–246.

Ori, A., Atzmony, D., Haviv, I., and Shaul, Y. (1994). An NF1 motif plays a central role in hepatitis B virus enhancer. Virology *204*, 600–608.

Orphanides, G., LeRoy, G., Chang, C.-H., Luse, D.S., and Reinberg, D. (1998). FACT, a Factor that Facilitates Transcript Elongation through Nucleosomes. Cell *92*, 105–116.

Osseman, Q., Gallucci, L., Au, S., Cazenave, C., Berdance, E., Blondot, M.-L., Cassany, A., Bégu, D., Ragues, J., Aknin, C., et al. (2018). The chaperone dynein LL1 mediates cytoplasmic transport of empty and mature hepatitis B virus capsids. J. Hepatol. *68*, 441–448.

Park, G.-S., Kim, H.-Y., Shin, H.-S., Park, S., Shin, H.-J., and Kim, K. (2008). Modulation of hepatitis B virus replication by expression of polymerase-surface fusion protein through splicing: implications for viral persistence. Virus Res. *136*, 166–174.

Perfumo, S., Amicone, L., Colloca, S., Giorgio, M., Pozzi, L., and Tripodi, M. (1992). Recognition efficiency of the hepatitis B virus polyadenylation signals is tissue specific in transgenic mice. J. Virol. *66*, 6819–6823.

Perri, S., and Ganem, D. (1997). Effects of mutations within and adjacent to the terminal repeats of hepatitis B virus pregenomic RNA on viral DNA synthesis. J. Virol. *71*, 8448–8455.

Petit, M.A., and Pillot, J. (1985). HBc and HBe antigenicity and DNA-binding activity of major core protein P22 in hepatitis B virus core particles isolated from the cytoplasm of human liver cells. J. Virol. *53*, 543–551.

Pol, J.G., Lekbaby, B., Redelsperger, F., Klamer, S., Mandouri, Y., Ahodantin, J., Bieche, I., Lefevre, M., Souque, P., Charneau, P., et al. (2015). Alternative splicing-regulated protein of hepatitis B virus hacks the TNF- α -stimulated signaling pathways and limits the extent of liver inflammation. FASEB J. 29, 1879–1889.

Pollicino, T., Belloni, L., Raffa, G., Pediconi, N., Squadrito, G., Raimondo, G., and Levrero, M. (2006). Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones. Gastroenterology *130*, 823–837.

Potenza, N., Papa, U., Mosca, N., Zerbini, F., Nobile, V., and Russo, A. (2011). Human microRNA hsa-miR-125a-5p interferes with expression of hepatitis B virus surface antigen. Nucleic Acids Res. *39*, 5157–5163.

Qi, Y., Gao, Z., Xu, G., Peng, B., Liu, C., Yan, H., Yao, Q., Sun, G., Liu, Y., Tang, D., et al. (2016). DNA Polymerase κ Is a Key Cellular Factor for the Formation of Covalently Closed Circular DNA of Hepatitis B Virus. PLoS Pathog. *12*, e1005893.

Qian, G., Hu, B., Zhou, D., Xuan, Y., Bai, L., and Duan, C. (2015). NIRF, a Novel Ubiquitin Ligase, Inhibits Hepatitis B Virus Replication Through Effect on HBV Core Protein and H3 Histones. DNA Cell Biol. *34*, 327–332.

Qin, J., Zhai, J., Hong, R., Shan, S., Kong, Y., Wen, Y., Wang, Y., Liu, J., and Xie, Y. (2009). Prospero-related homeobox protein (Prox1) inhibits hepatitis B virus replication through repressing multiple cis regulatory elements. J. Gen. Virol. *90*, 1246–1255.

Quarleri, J. (2014). Core promoter: A critical region where the hepatitis B virus makes decisions. World J. Gastroenterol. WJG *20*, 425–435.

Quasdorff, M., and Protzer, U. (2010). Control of hepatitis B virus at the level of transcription. J. Viral Hepat. *17*, 527–536.

Rabe, B., Vlachou, A., Panté, N., Helenius, A., and Kann, M. (2003). Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 9849–9854.

162

Rabe, B., Glebe, D., and Kann, M. (2006). Lipid-mediated introduction of hepatitis B virus capsids into nonsusceptible cells allows highly efficient replication and facilitates the study of early infection events. J. Virol. *80*, 5465–5473.

Rabe, B., Delaleau, M., Bischof, A., Foss, M., Sominskaya, I., Pumpens, P., Cazenave, C., Castroviejo, M., and Kann, M. (2009). Nuclear entry of hepatitis B virus capsids involves disintegration to protein dimers followed by nuclear reassociation to capsids. PLoS Pathog. *5*, e1000563.

Raney, A.K., Le, H.B., and McLachlan, A. (1992). Regulation of transcription from the hepatitis B virus major surface antigen promoter by the Sp1 transcription factor. J. Virol. *66*, 6912–6921.

Raney, A.K., Johnson, J.L., Palmer, C.N., and McLachlan, A. (1997). Members of the nuclear receptor superfamily regulate transcription from the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. J. Virol. *71*, 1058–1071.

Rawat, S., Clippinger, A.J., and Bouchard, M.J. (2012). Modulation of Apoptotic Signaling by the Hepatitis B Virus X Protein. Viruses *4*, 2945–2972.

Ren, J.-H., Tao, Y., Zhang, Z.-Z., Chen, W.-X., Cai, X.-F., Chen, K., Ko, B.C.B., Song, C.-L., Ran, L.-K., Li, W.-Y., et al. (2014). Sirtuin 1 Regulates Hepatitis B Virus Transcription and Replication by Targeting Transcription Factor AP-1. J. Virol. *88*, 2442–2451.

Rivière, L., Gerossier, L., Ducroux, A., Dion, S., Deng, Q., Michel, M.-L., Buendia, M.-A., Hantz, O., and Neuveut, C. (2015). HBx relieves chromatin-mediated transcriptional repression of hepatitis B viral cccDNA involving SETDB1 histone methyltransferase. J. Hepatol. *63*, 1093–1102.

Russnak, R., and Ganem, D. (1990). Sequences 5' to the polyadenylation signal mediate differential poly(A) site use in hepatitis B viruses. Genes Dev. *4*, 764–776.

Sagnelli, E., Potenza, N., Onorato, L., Sagnelli, C., Coppola, N., and Russo, A. (2018). Micro-RNAs in hepatitis B virus-related chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma. World J. Hepatol. *10*, 558–570.

Sato, H., Hosoda, N., and Maquat, L.E. (2008). Efficiency of the Pioneer Round of Translation Affects the Cellular Site of Nonsense-Mediated mRNA Decay. Mol. Cell 29, 255–262.

Saunders, A., Werner, J., Andrulis, E.D., Nakayama, T., Hirose, S., Reinberg, D., and Lis, J.T. (2003). Tracking FACT and the RNA Polymerase II Elongation Complex Through Chromatin in Vivo. Science *301*, 1094–1096.

Sawicka, K., Bushell, M., Spriggs, K.A., and Willis, A.E. (2008). Polypyrimidinetract-binding protein: a multifunctional RNA-binding protein. Biochem. Soc. Trans. *36*, 641–647.

Scaglioni, P.P., Melegari, M., and Wands, J.R. (1997). Posttranscriptional regulation of hepatitis B virus replication by the precore protein. J. Virol. *71*, 345–353.

Schmitz, A., Schwarz, A., Foss, M., Zhou, L., Rabe, B., Hoellenriegel, J., Stoeber, M., Panté, N., and Kann, M. (2010). Nucleoporin 153 Arrests the Nuclear Import of Hepatitis B Virus Capsids in the Nuclear Basket. PLOS Pathog. *6*, e1000741.

Schoenfelder, S., Sexton, T., Chakalova, L., Cope, N.F., Horton, A., Andrews, S., Kurukuti, S., Mitchell, J.A., Umlauf, D., Dimitrova, D.S., et al. (2010). Preferential associations between co-regulated genes reveal a transcriptional interactome in erythroid cells. Nat. Genet. *42*, 53–61.

Schreiner, S., and Nassal, M. (2017). A Role for the Host DNA Damage Response in Hepatitis B Virus cccDNA Formation—and Beyond? Viruses 9.

Schultz, U., Summers, J., Staeheli, P., and Chisari, F.V. (1999). Elimination of duck hepatitis B virus RNA-containing capsids in duck interferon-alpha-treated hepatocytes. J. Virol. 73, 5459–5465.

Seeger, C., Ganem, D., and Varmus, H.E. (1986). Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. Science 232, 477–484.

Seitz, S., Iancu, C., Volz, T., Mier, W., Dandri, M., Urban, S., and Bartenschlager, R. (2016). A Slow Maturation Process Renders Hepatitis B Virus Infectious. Cell Host Microbe *20*, 25–35.

Selzer, L., Kant, R., Wang, J.C.-Y., Bothner, B., and Zlotnick, A. (2015). Hepatitis B Virus Core Protein Phosphorylation Sites Affect Capsid Stability and Transient Exposure of the C-terminal Domain. J. Biol. Chem.

Seo, H.W., Seo, J.P., and Jung, G. (2018). Heat shock protein 70 and heat shock protein 90 synergistically increase hepatitis B viral capsid assembly. Biochem. Biophys. Res. Commun. *503*, 2892–2898.

Sharma, N., Zhu, Q., Wani, G., He, J., Wang, Q., and Wani, A.A. (2014). USP3 counteracts RNF168 via deubiquitinating H2A and γH2AX at lysine 13 and 15. Cell Cycle Georget. Tex *13*, 106–114.

Sharma, R.R., Dhiman, R.K., Chawla, Y., and Vasistha, R.K. (2002). Immunohistochemistry for core and surface antigens in chronic hepatitis. Trop. Gastroenterol. Off. J. Dig. Dis. Found. 23, 16–19. Shaul, Y., Ben-Levy, R., and De-Medina, T. (1986). High affinity binding site for nuclear factor I next to the hepatitis B virus S gene promoter. EMBO J. *5*, 1967–1971.

Sheen, I.-S., Tsou, Y.-K., Lin, S.-M., Lin, C.-J., Lin, C.-C., Hsu, C.-W., Chen, Y.-C., Chang, M.-L., and Yeh, C.-T. (2007). Nuclear HBcAg and histology activity index as independent predictors of the expression of singly spliced HBV-RNA. J. Viral Hepat. *14*, 70–74.

Shen, X., and Gorovsky, M.A. (1996). Linker Histone H1 Regulates Specific Gene Expression but Not Global Transcription In Vivo. Cell *86*, 475–483.

Sheraz, M., Cheng, J., Tang, L., Chang, J., and Guo, J.-T. (2019). Cellular DNA Topoisomerases Are Required for the Synthesis of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA. J. Virol. *93*, e02230-18.

Simonsen, C.C., and Levinson, A.D. (1983). Analysis of processing and polyadenylation signals of the hepatitis B virus surface antigen gene by using simian virus 40-hepatitis B virus chimeric plasmids. Mol. Cell. Biol. *3*, 2250–2258.

Sirma, H., Giannini, C., Poussin, K., Paterlini, P., Kremsdorf, D., and Bréchot, C. (1999). Hepatitis B virus X mutants, present in hepatocellular carcinoma tissue abrogate both the antiproliferative and transactivation effects of HBx. Oncogene *18*, 4848.

Somiya, M., Sasaki, Y., Matsuzaki, T., Liu, Q., Iijima, M., Yoshimoto, N., Niimi, T., Maturana, A.D., and Kuroda, S. (2015). Intracellular trafficking of bio-nanocapsule– liposome complex: Identification of fusogenic activity in the pre-S1 region of hepatitis B virus surface antigen L protein. J. Controlled Release *212*, 10–18.

Sommer, G. (2008). Posttranscriptional control of HBV gene expression. Front. Biosci. *Volume*, 5533.

Soussan, P., Garreau, F., Zylberberg, H., Ferray, C., Brechot, C., and Kremsdorf, D. (2000). In vivo expression of a new hepatitis B virus protein encoded by a spliced RNA. J. Clin. Invest. *105*, 55–60.

Soussan, P., Tuveri, R., Nalpas, B., Garreau, F., Zavala, F., Masson, A., Pol, S., Brechot, C., and Kremsdorf, D. (2003). The expression of hepatitis B spliced protein (HBSP) encoded by a spliced hepatitis B virus RNA is associated with viral replication and liver fibrosis. J. Hepatol. *38*, 343–348.

Stevens, C.E., Toy, P., Kamili, S., Taylor, P.E., Tong, M.J., Xia, G.-L., and Vyas, G.N. (2017). Eradicating hepatitis B virus: The critical role of preventing perinatal transmission. Biologicals *50*, 3–19.

Stoeckl, L., Funk, A., Kopitzki, A., Brandenburg, B., Oess, S., Will, H., Sirma, H., and Hildt, E. (2006). Identification of a structural motif crucial for infectivity of hepatitis B viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 6730–6734.

Su, A.I., Pezacki, J.P., Wodicka, L., Brideau, A.D., Supekova, L., Thimme, R., Wieland, S., Bukh, J., Purcell, R.H., Schultz, P.G., et al. (2002). Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 15669–15674.

Su, Q., Schröder, C.H., Hofmann, W.J., Otto, G., Pichlmayr, R., and Bannasch, P. (1998). Expression of hepatitis B virus X protein in HBV-infected human livers and hepatocellular carcinomas. Hepatol. Baltim. Md *27*, 1109–1120.

Su, T.S., Lai, C.J., Huang, J.L., Lin, L.H., Yauk, Y.K., Chang, C.M., Lo, S.J., and Han, S.H. (1989). Hepatitis B virus transcript produced by RNA splicing. J. Virol. *63*, 4011–4018.

Summers, J., O'Connell, A., and Millman, I. (1975). Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72, 4597–4601.

Sun, S., Nakashima, K., Ito, M., Li, Y., Chida, T., Takahashi, H., Watashi, K., Sawasaki, T., Wakita, T., and Suzuki, T. (2017). Involvement of PUF60 in Transcriptional and Post-transcriptional Regulation of Hepatitis B Virus Pregenomic RNA Expression. Sci. Rep. *7*.

Sung, W.-K., Zheng, H., Li, S., Chen, R., Liu, X., Li, Y., Lee, N.P., Lee, W.H., Ariyaratne, P.N., Tennakoon, C., et al. (2012). Genome-wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma. Nat. Genet. *44*, 765–769.

Tacke, F., Liedtke, C., Bocklage, S., Manns, M.P., and Trautwein, C. (2005). CREB/PKA sensitive signalling pathways activate and maintain expression levels of the hepatitis B virus pre-S2/S promoter. Gut *54*, 1309–1317.

Tai, P.-C., Suk, F.-M., Gerlich, W.H., Neurath, A.R., and Shih, C. (2002). Hypermodification and immune escape of an internally deleted middle-envelope (M) protein of frequent and predominant hepatitis B virus variants. Virology *292*, 44–58.

Takagaki, Y., and Manley, J.L. (1997). RNA recognition by the human polyadenylation factor CstF. Mol. Cell. Biol. *17*, 3907–3914.

Tamori, A., Yamanishi, Y., Kawashima, S., Kanehisa, M., Enomoto, M., Tanaka, H., Kubo, S., Shiomi, S., and Nishiguchi, S. (2005). Alteration of Gene Expression in Human Hepatocellular Carcinoma with Integrated Hepatitis B Virus DNA. Clin. Cancer Res. *11*, 5821–5826.
Tang, H., and McLachlan, A. (2002). A pregenomic RNA sequence adjacent to DR1 and complementary to epsilon influences hepatitis B virus replication efficiency. Virology *303*, 199–210.

Tang, J., Zhang, Z.-H., Huang, M., Heise, T., Zhang, J., and Liu, G.-L. (2013). Phosphorylation of human La protein at Ser 366 by casein kinase II contributes to hepatitis B virus replication and expression in vitro. J. Viral Hepat. *20*, 24–33.

Tennant, B.C., Toshkov, I.A., Peek, S.F., Jacob, J.R., Menne, S., Hornbuckle, W.E., Schinazi, R.D., Korba, B.E., Cote, P.J., and Gerin, J.L. (2004). Hepatocellular carcinoma in the woodchuck model of hepatitis B virus infection. Gastroenterology *127*, S283-293.

Terré, S., Petit, M.A., and Bréchot, C. (1991). Defective hepatitis B virus particles are generated by packaging and reverse transcription of spliced viral RNAs in vivo. J. Virol. *65*, 5539–5543.

Thomson, J.P., Skene, P.J., Selfridge, J., Clouaire, T., Guy, J., Webb, S., Kerr, A.R.W., Deaton, A., Andrews, R., James, K.D., et al. (2010). CpG islands influence chromatin structure via the CpG-binding protein Cfp1. Nature *464*, 1082–1086.

Tokusumi, Y., Zhou, S., and Takada, S. (2004). Nuclear Respiratory Factor 1 Plays an Essential Role in Transcriptional Initiation from the Hepatitis B Virus X Gene Promoter. J. Virol. *78*, 10856–10864.

Tropberger, P., Mercier, A., Robinson, M., Zhong, W., Ganem, D.E., and Holdorf, M. (2015). Mapping of histone modifications in episomal HBV cccDNA uncovers an unusual chromatin organization amenable to epigenetic manipulation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *112*, E5715-5724.

Truant, R., Antunovic, J., Greenblatt, J., Prives, C., and Cromlish, J.A. (1995). Direct interaction of the hepatitis B virus HBx protein with p53 leads to inhibition by HBx of p53 response element-directed transactivation. J. Virol. *69*, 1851–1859.

Tsuge, M., Hiraga, N., Akiyama, R., Tanaka, S., Matsushita, M., Mitsui, F., Abe, H., Kitamura, S., Hatakeyama, T., Kimura, T., et al. (2010). HBx protein is indispensable for development of viraemia in human hepatocyte chimeric mice. J. Gen. Virol. *91*, 1854–1864.

Tu, T., Mason, W.S., Clouston, A.D., Shackel, N.A., McCaughan, G.W., Yeh, M.M., Schiff, E.R., Ruszkiewicz, A.R., Chen, J.W., Harley, H. a. J., et al. (2015). Clonal expansion of hepatocytes with a selective advantage occurs during all stages of chronic hepatitis B virus infection. J. Viral Hepat. *22*, 737–753.

Umetsu, T., Inoue, J., Kogure, T., Kakazu, E., Ninomiya, M., Iwata, T., Takai, S., Nakamura, T., Sano, A., and Shimosegawa, T. (2018). Inhibitory effect of silibinin on hepatitis B virus entry. Biochem. Biophys. Rep. *14*, 20–25.

Volz, T., Allweiss, L., MBarek, M.B., Warlich, M., Lohse, A.W., Pollok, J.M., Alexandrov, A., Urban, S., Petersen, J., Lütgehetmann, M., et al. (2013). The entry inhibitor Myrcludex-B efficiently blocks intrahepatic virus spreading in humanized mice previously infected with hepatitis B virus. J. Hepatol. *58*, 861–867.

Wang, G.H., and Seeger, C. (1992). The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis. Cell *71*, 663–670.

Wang, Y., and Li, Y. (2018). miR-146 promotes HBV replication and expression by targeting ZEB2. Biomed. Pharmacother. *99*, 576–582.

Wang, Y., and Tian, H. (2017). miR-101 suppresses HBV replication and expression by targeting FOXO1 in hepatoma carcinoma cell lines. Biochem. Biophys. Res. Commun. *487*, 167–172.

Wang, J.C.-Y., Dhason, M.S., and Zlotnick, A. (2012). Structural Organization of Pregenomic RNA and the Carboxy-Terminal Domain of the Capsid Protein of Hepatitis B Virus. PLoS Pathog. *8*.

Wang, Y., Jiang, L., Ji, X., Yang, B., Zhang, Y., and Fu, X.-D. (2013). Hepatitis B viral RNA directly mediates down-regulation of the tumor suppressor microRNA miR-15a/miR-16-1 in hepatocytes. J. Biol. Chem. *288*, 18484–18493.

Waris, G., and Siddiqui, A. (2002). Interaction between STAT-3 and HNF-3 Leads to the Activation of Liver-Specific Hepatitis B Virus Enhancer 1 Function. J. Virol. *76*, 2721–2729.

Watanabe, T., Sorensen, E.M., Naito, A., Schott, M., Kim, S., and Ahlquist, P. (2007). Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 10205–10210.

Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M.B., Ramos, L., Pääbo, S., Rebhan, M., and Schübeler, D. (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. Nat. Genet. *39*, 457–466.

Wieland, S., Thimme, R., Purcell, R.H., and Chisari, F.V. (2004). Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 6669–6674.

Williams, T., Ngo, L.H., and Wickramasinghe, V.O. (2018). Nuclear export of RNA: Different sizes, shapes and functions. Semin. Cell Dev. Biol. *75*, 70–77.

Winans, S., Larue, R.C., Abraham, C.M., Shkriabai, N., Skopp, A., Winkler, D., Kvaratskhelia, M., and Beemon, K.L. (2017). The FACT Complex Promotes Avian Leukosis Virus DNA Integration. J. Virol. *91*, e00082-17.

Wu, X., and Brewer, G. (2012). The Regulation of mRNA Stability in Mammalian Cells: 2.0. Gene *500*, 10–21.

Wu, H.-J., Zhuo, Y., Zhou, Y.-C., Wang, X.-W., Wang, Y.-P., Si, C.-Y., and Wang, X.-H. (2017). miR-29a promotes hepatitis B virus replication and expression by targeting SMARCE1 in hepatoma carcinoma. World J. Gastroenterol. *23*, 4569–4578.

Wu, H.L., Chen, P.J., Tu, S.J., Lin, M.H., Lai, M.Y., and Chen, D.S. (1991). Characterization and genetic analysis of alternatively spliced transcripts of hepatitis B virus in infected human liver tissues and transfected HepG2 cells. J. Virol. *65*, 1680–1686.

Wu, S.-X., Chen, W.-N., Jing, Z.-T., Liu, W., Lin, X.-J., and Lin, X. (2018). Hepatitis B Spliced Protein (HBSP) Suppresses Fas-Mediated Hepatocyte Apoptosis via Activation of PI3K/Akt Signaling. J. Virol. 92.

Wynne, S.A., Crowther, R.A., and Leslie, A.G.W. (1999). The Crystal Structure of the Human Hepatitis B Virus Capsid. Mol. Cell *3*, 771–780.

Xiang, A., Ren, F., Lei, X., Zhang, J., Guo, R., Lu, Z., and Guo, Y. (2015). The hepatitis B virus (HBV) core protein enhances the transcription activation of CRE via the CRE/CREB/CBP pathway. Antiviral Res. *120*, 7–15.

Yan, H., Zhong, G., Xu, G., He, W., Jing, Z., Gao, Z., Huang, Y., Qi, Y., Peng, B., Wang, H., et al. (2012). Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. ELife *1*, e00049.

Yang, C.-C., Huang, E.-Y., Li, H.-C., Su, P.-Y., and Shih, C. (2014). Nuclear Export of Human Hepatitis B Virus Core Protein and Pregenomic RNA Depends on the Cellular NXF1-p15 Machinery. PLoS ONE *9*.

Yang, C.-C., Li, H.-C., and Shih, C. (2017a). A Homokaryon Assay for Nucleocytoplasmic Shuttling Activity of HBV Core Protein. In Hepatitis B Virus: Methods and Protocols, H. Guo, and A. Cuconati, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 53–58.

Yang, X., Li, H., Sun, H., Fan, H., Hu, Y., Liu, M., Li, X., and Tang, H. (2017b). Hepatitis B Virus-Encoded MicroRNA Controls Viral Replication. J. Virol. *91*.

Yang, Y., Zheng, B., Han, Q., Zhang, C., Tian, Z., and Zhang, J. (2016). Targeting blockage of STAT3 inhibits hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. Cancer Biol. Ther. *17*, 449–456.

Yao, Y., Yang, B., Cao, H., Zhao, K., Yuan, Y., Chen, Y., Zhang, Z., Wang, Y., Pei, R., Chen, J., et al. (2018). RBM24 stabilizes hepatitis B virus pregenomic RNA but inhibits core protein translation by targeting the terminal redundancy sequence. Emerg. Microbes Infect. *7*.

Yao, Y., Yang, B., Chen, Y., Wang, H., Hu, X., Zhou, Y., Gao, X., Lu, M., Niu, J., Wen, Z., et al. (2019). RNA-Binding Motif Protein 24 (RBM24) Is Involved in Pregenomic RNA Packaging by Mediating Interaction between Hepatitis B Virus Polymerase and the Epsilon Element. J. Virol. 93.

Yeh, C.T., Wong, S.W., Fung, Y.K., and Ou, J.H. (1993). Cell cycle regulation of nuclear localization of hepatitis B virus core protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *90*, 6459–6463.

Yu, X., and Mertz, J.E. (1996). Promoters for synthesis of the pre-C and pregenomic mRNAs of human hepatitis B virus are genetically distinct and differentially regulated. J. Virol. *70*, 8719–8726.

Yuen, M.-F., Sablon, E., Yuan, H.-J., Hui, C.-K., Wong, D.K.-H., Doutreloigne, J., Wong, B.C.-Y., Chan, A.O.-O., and Lai, C.-L. (2002). Relationship between the Development of Precore and Core Promoter Mutations and Hepatitis B e Antigen Seroconversion in Patients with Chronic Hepatitis B Virus. J. Infect. Dis. *186*, 1335–1338.

Zahn, A., and Allain, J.-P. (2005). Hepatitis C virus and hepatitis B virus bind to heparin: purification of largely IgG-free virions from infected plasma by heparin chromatography. J. Gen. Virol. *86*, 677–685.

Zang, W.-Q., and Benedict Yen, T.S. (1999). Distinct Export Pathway Utilized by the Hepatitis B Virus Posttranscriptional Regulatory Element. Virology *259*, 299–304.

Zang, W.-Q., Li, B., Huang, P.-Y., Lai, M.M.C., and Yen, T.S.B. (2001). Role of Polypyrimidine Tract Binding Protein in the Function of the Hepatitis B Virus Posttranscriptional Regulatory Element. J. Virol. *75*, 10779–10786.

Zarudnaya, M.I., Kolomiets, I.M., Potyahaylo, A.L., and Hovorun, D.M. (2003). Downstream elements of mammalian pre-mRNA polyadenylation signals: primary, secondary and higher-order structures. Nucleic Acids Res. *31*, 1375–1386.

Zhang, G., Li, Y., Zheng, S., Liu, M., Li, X., and Tang, H. (2010). Suppression of hepatitis B virus replication by microRNA-199a-3p and microRNA-210. Antiviral Res. *88*, 169–175.

Zhang, H., Xing, Z., Mani, S.K.K., Bancel, B., Durantel, D., Zoulim, F., Tran, E.J., Merle, P., and Andrisani, O. (2016). RNA helicase DEAD box protein 5 regulates Polycomb repressive complex 2/Hox transcript antisense intergenic RNA function in

hepatitis B virus infection and hepatocarcinogenesis. Hepatol. Baltim. Md 64, 1033– 1048.

Zhang, T., Zhang, J., Cui, M., Liu, F., You, X., Du, Y., Gao, Y., Zhang, S., Lu, Z., Ye, L., et al. (2013a). Hepatitis B virus X protein inhibits tumor suppressor miR-205 through inducing hypermethylation of miR-205 promoter to enhance carcinogenesis. Neoplasia N. Y. N *15*, 1282–1291.

Zhang, W., Chen, J., Wu, M., Zhang, X., Zhang, M., Yue, L., Li, Y., Liu, J., Li, B., Shen, F., et al. (2017). PRMT5 restricts hepatitis B virus replication through epigenetic repression of covalently closed circular DNA transcription and interference with pregenomic RNA encapsidation. Hepatology *66*, 398–415.

Zhang, X., Cheng, J., Ma, J., Hu, Z., Wu, S., Hwang, N., Kulp, J., Du, Y., Guo, J.-T., and Chang, J. (2019). Discovery of novel hepatitis B virus nucleocapsid assembly inhibitors. ACS Infect. Dis. *5*, 759–768.

Zhang, Y., Li, C., Zhang, Y., Zhu, H., Kang, Y., Liu, H., Wang, J., Qin, Y., Mao, R., Xie, Y., et al. (2013b). Comparative Analysis of CpG Islands among HBV Genotypes. PLoS ONE *8*, e56711.

Zhang, Y., Mao, R., Yan, R., Cai, D., Zhang, Y., Zhu, H., Kang, Y., Liu, H., Wang, J., Qin, Y., et al. (2014). Transcription of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA Is Regulated by CpG Methylation during Chronic Infection. PLoS ONE 9.

Zhao, Q., Hu, Z., Cheng, J., Wu, S., Luo, Y., Chang, J., Hu, J., and Guo, J.-T. (2018). Hepatitis B virus core protein dephosphorylation occurs during pregenomic RNA encapsidation. J. Virol.

Zheng, Y., Fu, X., and Ou, J.-H.J. (2005). Suppression of hepatitis B virus replication by SRPK1 and SRPK2 via a pathway independent of the phosphorylation of the viral core protein. Virology *342*, 150–158.

Zinder, J.C., and Lima, C.D. (2017). Targeting RNA for processing or destruction by the eukaryotic RNA exosome and its cofactors. Genes Dev. *31*, 88–100.

Zlatanova, J. (1990). Histone H1 and the regulation of transcription of eukaryotic genes. Trends Biochem. Sci. *15*, 273–276.

Zlotnick, A., Palmer, I., Kaufman, J.D., Stahl, S.J., Steven, A.C., and Wingfield, P.T. (1999). Separation and crystallization of T = 3 and T = 4 icosahedral complexes of the hepatitis B virus core protein. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. *55*, 717–720.

Annexes

Hepatitis B virus replicating in hepatocellular carcinoma encodes HBx variants with preserved ability to antagonize restriction by Smc5/6

En révision – Antiviral Research

Highlights

HBV variants replicating in hepatocellular carcinoma are different from those replicating in the non tumoral liver.

Transcription of HBV cccDNA, which correlate with their ability to counteract the restriction factors Smc6/5.

Most HBx variants encoded by tumoral strains have lost their antiproliferative activity.

Lise Rivière^{1,2,*}, Barbara Quioc-Salomon^{1,2,3,*}, Guillaume Fallot⁴, Boris Halgand^{4,5,6}, Cyrille Féray⁴, Marie-Annick Buendia⁴ and Christine Neuveut^{1,2}

¹CNRS, UMR 3569, 75015 Paris

² Institut Pasteur, Department of Virology, Paris, France.

³ Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

⁴ INSERM U1193, Paris-Sud University, Paul Brousse Hospital, Villejuif, France.

Present address:

⁵ CHU Nantes, PHU4 OTONN, Nantes, F-44093, France

⁶ Inserm, UMR 1229, RMeS, Regenerative Medicine and Skeleton, Université de Nantes, ONIRIS, Nantes, F-44042, France

*Equal contributors

Correspondence : C.N. email : <u>christine.neuveut@pasteur.fr</u>

Keywords: HBV, HCC, HBx, Smc5/6, HBx tumor variants

List of Abbreviations:

HBV: Hepatitis B Virus; pgRNA: pregenomic RNA; RC-DNA: relaxed-circular HBV DNA cccDNA: covalently closed circular HBV DNA; Smc5/6: structural maintenance of the chromosome proteins 5/6; vp: viral particles; MOI: multiplicity of infection; dHepaRG: differentiated HepaRG; CCNA2: cyclin A2; ORFs: open reading frames; T: tumor; NT: non tumor ; FL-HBx: full length HBx; HTLV-1: T-cell lymphotropic virus type 1; ALT :T-cell leukemia/lymphoma.

Abstract

Hepatitis B virus infection is a major cause of liver diseases including hepatocellular carcinoma (HCC). The viral regulatory protein HBx is essential for viral replication and has been involved in the development of HCC. Recently, we characterized a subset of HCCs that replicate HBV. Our aim was to characterize HBx encoded by the full-length HBV DNA (cccDNA) in HCC and non-HCC liver. HBx genes were amplified and sequenced from eight paired HCC and non-HCC tissues in which HBV cccDNA and pgRNA were both present. Sequence analyses identified twelve amino acid positions mutated between HCC and non-HCC liver, and detected in at least three cases. We next assessed the impact of these mutations on HBx function by testing their transcriptional activity. We examined their ability to rescue the transcription of HBV virus deficient for HBx in differentiated HepaRG cells and to induce Smc5/6 degradation, which is mandatory for viral replication. We assessed their capacity to activate a CREB-dependent reporter. Finally we analyzed their growth suppressive activity using colony formation assays. Our results showed that most HBx variants isolated from HCC retain their ability to support HBV cccDNA transcription and to degrade Smc5/6. Strikingly, HCC specific HBx variants are impaired in their antiproliferative activity, which may be detrimental for tumor growth. In conclusion, in contrast to previous observations that tumor HBx variants lack transcriptional activity, we showed here that HBx variants have retained their ability to counteract Smc5/6 and thus to activate cccDNA transcription although they tend to lose antiproliferative activity.

1.Introduction

Hepatitis B virus (HBV) is a widespread pathogen and one of the most important environmental risk factors in human cancer epidemiology. Despite the existence of an effective vaccine, the number of chronic HBV-carriers worldwide reaches 250 million individuals, who are at high risk of developing hepatocellular carcinoma (Buendia and Neuveut, 2015).

HBV-induced oncogenesis may involve a combination of direct and indirect effects of the virus during the multistep process of liver carcinogenesis. Liver inflammation and hepatocyte proliferation driven by host immune responses are recognized driving forces of liver cell transformation. Genetic and epigenetic alterations also result from viral DNA integration into cellular chromosomes and from prolonged expression of viral gene products. Notably, the transcriptional regulatory protein HBx encoded by the X gene is endowed with tumor promoter activity (Riviere et al., 2013).

HBV is a prototypical member of the hepadnavirus family of DNA viruses that preferentially target hepatocytes and share the unusual feature of replicating their genome via the retrotranscription of the viral pregenomic RNA (pgRNA) into a partially double stranded relaxed circular DNA (RC-DNA) intermediate. Upon infection, RC-DNA is delivered to the nucleus and converted into a covalently closed circular DNA (cccDNA) that serves as a template for the transcription of all viral RNAs (Seeger and Mason, 2015). The cccDNA contains four overlapping open reading frames (ORFs) encoding 7 main proteins including the regulatory protein HBx.

HBx is essential for virus replication (Zoulim et al., 1994), and it is believed to act primarily at the level of transcription (Keasler et al., 2007; Leupin et al., 2005; Tang et al., 2005). In the setting of infection, HBx expression was shown to be essential for HBV RNA expression through the establishment of an active chromatin state (Lucifora et al., 2011; Riviere et al., 2015a). HBx transcriptional activity depends on different mechanisms including the assembly of coactivator-transcription factor complexes that modulate transcription and chromatin (Belloni et al., 2009; Cougot et al., 2007, Cougot, 2012 #7290; Riviere et al., 2015b). HBx is also known to bind DDB1, a core subunit of the Cul4A-based ubiquitin E3 ligase complex, and this interaction is essential for virus replication and for the maintenance of HBx transcriptional activity. Through its interaction with DDB1, HBx acts as an adaptor for the E3 Cul4A/DDB1 complex, which induces the ubiquitination of one or more substrates. Recently, it has been shown that HBx induces the degradation of structural maintenance of the chromosome proteins 5/6 (Smc5/6) allowing HBV transcription

(Decorsiere et al., 2016). Besides its role on HBV transcription, HBx may play a role as a cofactor in oncogenesis. The HBx protein induces liver cancer in a few transgenic mouse models, and cooperates with oncogenes or chemical carcinogens to promote hepatocarcinogenesis (Benhenda et al., 2009a). Search for HBx variants expressed specifically in tumor tissues has revealed two major types of changes: point mutations and Cterminal truncations resulting from preferential integration of HBV at the direct repeats DR1 and DR2 sites (Sung et al., 2012). C-terminal truncated variants have lost transcriptional activity and antiproliferative activity of wild type full length HBx (FL-HBx), and have acquired novel properties such as promotion of cell growth and cooperation with oncogenes in cell transformation (Liu et al., 2012; Tu et al., 2001; Xu et al., 2007). Additionally, point mutations have been reported in FL-HBx sequences that can be encoded by either free or integrated HBV DNA, (Chen et al., 2005; Liu et al., 2014; Liu et al., 2008), with variable impact on HBx transcriptional and antiproliferative activities (Kwun and Jang, 2004; Lin et al., 2005; Liu et al., 2014).

Recent studies using more sensitive methods could detect cccDNA in tumor samples in addition to integrated viral DNA (Bai et al., 2013; Halgand et al., 2018; Marchio et al., 2018). While the transcriptional status of tumor cccDNA has not been precisely studied, HBV transcription and replication can occur at variable levels in tumor cells, and could be responsible for HBV reactivation after liver transplantation (Altinel et al., 2016; Bai et al., 2013; Faria et al., 2008). Our recent study has demonstrated that HBV replication occurs in a subset of tumors characterized by a weakly invasive phenotype and a specific transcriptomic signature. In support of this finding, we found genotypic differences between virus in tumor (T) and virus in non tumor (NT) in 11/63 cases, arguing that HBV replicates in tumor cells (Halgand et al., 2018).

The aim of the present study is to assess whether the HBx proteins encoded by fulllength HBV DNA (cccDNA) in HCC contain specific mutations and harbor particular activities. We show that contrary to what has been shown for HBx expressed from integrated HBV DNA in tumors, most of HBx variants isolated from tumors replicating HBV retain their ability to support HBV cccDNA transcription and to degrade Smc5/6. Moreover, in parallel, they tend to lose antiproliferative activity, which can be viewed as detrimental for tumor growth, as demonstrated for HBx expressed from integrated sequences. Interestingly, some mutants have lost antiproliferative activity but can still support cccDNA transcription, suggesting that these two activities are distinct.

2. Methods

2.1. Amplification and cloning of HBx natural variants

The amplification and cloning of HBx from T and NT liver samples extracted from the French liver Biobanks network-INCa have been described previously (Halgand et al., 2018). Briefly, frozen tissues were homogenized using Precellys beads and total DNA was extracted using the MasterPure Complete DNA purification kit (Epicentre). Full-length HBV genome (3.2 kb) was first amplified as described by (Gunther et al., 1995) with sense P1(5'-CCG GAA AGC TTA TGC TCT TCT TTT TCA CCT CTG CCT AAT CAT C-3') and antisense P2 (5'-CCG GAG AGC TCA TGC TCT TCA AAA AGT TGC ATG GTG CTG GTG-3') primers and the whole X gene was then amplified using a nested-PCR assay with HBx-1262 sens (5'-GAT CCA TAC TGC GGA ACT CC-3') and antisense P2 (5'-CCG GAG AGC TCA TGC TCT TCA AAA AGT TGC ATG GTG CTG GTG-3') primers (Halgand et al., 2018). PCRs were performed using a hot-start procedure with the Expand High-Fidelity PCR System (Roche Diagnostics, France), according to the manufacturer's instructions. To study HBx originating from the complete (i.e. non-integrated) HBV episomal DNA we only analysed samples for which the internal primer set (primers HBx-1262 sens and antisense P2) was unable to amplify the X gene without preliminary amplification of the whole genome with primers P1 and P2. The nested PCR products were cloned into the pCR4 plasmid (TOPO TA cloning Kit) and sequenced (Halgand et al., 2018). 5 to 45 clones (mean: 20 ± 14) per sample were consequently sequenced bidirectionally by universal priming by GATC Biotech (Konstanz, Germany). The sequences were aligned using the Clustal module of MEGA software with a panel of complete HBV genotypes retrieved from public databases. The references are for: A genotypes: AF090842.1, X02763.1, X51970.1, AY738142, AY934772, Z72478, AB116077, AM180624, FJ692554, GQ331048; B genotypes: AB033554.1, AF100309.1, AB033554, AF100309, D00330, AB073828, AY596111, AB010291, M54923, D00331; C genotypes: AB014381.1, AY123041.1, X04615.1, AB014381, AB112348, AY217376, M38636, X75665, AF241410, AB493840, M12906; D genotypes: M32138.1, X85254.1, X59795, EU594396, AB222709, AB109475, Z35716, X80925, X65257, DQ315779; E genotypes: X75657.1, AB032431.1, AB194947, AB194948, X75657; F genotypes: AB036910.1, AF223965.1, X69798.1, X69798, AY090461, AY090455, AF223964, DQ899147, DQ899150, AF223962; G genotypes: AB064310.1, AF160501.1, AF405706.1, AB056513, AF160501, AB064311, AB056515; H genotypes: AY090454.1, AY090457.1, AY090460.1, AB266536, AB059661, AB059660, AB205010, EF157291, AB179747, AB064315. We then selected the more frequently represented sequence for each T and NT samples for further studies.

The N-terminal HA-tagged HBx T and NT variants from 11 liver samples were cloned at the BgIII and Xho sites into pcDNA3.1 and into the lentiviral pTRIPΔU3 vector. Virions were produced by calcium phosphate transfection of HEK293T cells as previously described (Riviere et al., 2015a). Supernatants were collected 3 days after transfection and virus was purified by ultracentrifugation through a 20% (wt/vol) sucrose cushion. Virus production was normalized by measuring supernatant reverse transcriptase (RT) activity.

2.2. Cells and HBV production

HeLa and HEK 293T cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10% foetal calf serum (FCS). HepG2 H1.3 Δx cells are derived from HepG2 cells and contain an integrated 1.3 HBV genome that carries a stop codon mutation in both HBx open reading frames (Lucifora et al., 2011). HepaRG cells were grown in a standard medium: William's E medium supplemented with 10% FCS, 7 x 10-5 M hydrocortisone hemisuccinate, and 5 µg/ml insulin. For differentiation (dHepaRG), HepaRG cells were maintained for 2 weeks in standard medium then for at least 2 weeks in standard medium with 1.8% dimethylsulfoxide (DMSO) and EGF (5ng/ml) (PeproTech-Tebu France), as previously described (Gripon et al., 2002).

For production of HBV deficient of HBx expression (HBV X-), HepG2 H1.3∆x cells were grown in Williams E medium supplemented with 5% FCS, 7.10⁻⁵M hydrocortisone hemisuccinate, 5 mg/ml insulin, and 2% DMSO. HBV particles were concentrated from the clarified supernatant through overnight precipitation in 5% PEG 8000 followed by centrifugation at 4°C (60 min at 5,292g). Titers of the enveloped DNA-containing viral particles were determined by immunoprecipitation with an anti-preS1 antibody (gift by C. Sureau, dilution 1/2000), followed by qPCR quantification of viral RC-DNA using RC primers: (5'-CACTCTATGGAAGGCGGGTA-3') 3' RC 5' and RC (5'-TGCTCCAGCTCCTACCTTGT-3'). Enveloped DNA-containing viral particles (vp) quantification was used to normalize for virus infection, and multiplicities of infection (MOI) were expressed as vp per cell.

2.3. Plasmids

The RSV-cyclic AMP-dependent kinase (PKA) expression construct was obtained from R. Maurer (Maurer, 1989). The pCRE-Luc reporter plasmid, which carries four consensus CRE sites, was from Stratagene. The N-terminally HA-tagged HBx (adw subtype) (HA-HBx) expression vector has been described previously (Cougot et al., 2007). pTRIP-Flag-HA-HBx plasmid was generated by cloning the BglII-KpnI fragment containing wild type Flag-HA-HBx cDNA in the BamHI-KpnI sites of the lentiviral vector pTRIPAU3 (Benhenda et al., 2013). Plasmid encoding DDB1 fused to FLAG tag has been previously described.

2.4. HBV X- infection and trans-complementation assay

dHepaRG cells were infected with normalized amounts of HBV X- virus at MOI of 100 vp/cell, as described (Riviere et al., 2015a). Briefly, cells were incubated over night with the inoculum in presence of 4% of PEG 8000. Seven days later, infected cells were transduced with normalized amounts of control lentiviral vector (TRIP Mock) or lentiviral vector encoding HA-tagged HBxwt or HA-tagged HBx variants. Four days after transduction, HBV transcription was analyzed by RT-qPCR. The level of HBV RNA in cells transduced with TRIP Mock was set to 1.

2.5. Quantitative RT-PCR (RT-qPCR)

Total RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen) and treated with TURBO DNase (Ambion). RNA (500 ng) was retrotranscribed using random primers and RevertAid H Minus M-MuLV reverse transcriptase (Fermentas). cDNA was amplified by quantitative PCR (qPCR) using SybrGreen PCR Master mix (Applied Biosystems) on ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) using standard qPCR protocol (Ducroux et al., 2014). For relative quantifications Rhot2 was used as a reference gene because of its low variation coefficient in human liver tumors and cell lines (Cairo et al., 2008). Values were calculated according to the ΔCt quantification method with $\Delta Ct = Ct$ HBV – Ct Rhot2. Results are expressed as the average of at least three independent experiments. Standard error of (SEM) indicated. The HBV the mean are primers **RNAall-F** (TGAACCTTTACCCCGTTGCC) and HBV RNAall-R (GTATGGATCGGCAGAGGAGC) amplify all HBV transcripts (pregenomic RNA (pgRNA) as well as the 2.4 and 2.1 kb mRNA) except the 0.8 Kb transcript encoding HBx. The primers used to quantify Rhot2 Rhot2-F (CTGCGGACTATCTCTCCCCTC) were; and Rhot2-R (AAAAGGCTTTGCAGCTCCAC)

2.6. Luciferase assay

HeLa cells were co-transfected using Exgen reagent (Euromedex) with 0.5 ugpCRE-Luc reporter plasmid together with RSV-PKA (0.1 ug) and HBx plasmids as indicated. Total amounts of transfected DNA were kept constant by adding corresponding empty vectors. Cells were lysed 48 h later and assayed for luciferase activity. Since HBx is known to activate transcription of transfected episomal DNA such as the thymidine kinase-ß-galactosidase plasmid used for transfection efficiency normalization, we therefore confirmed the results by multiple independent assays.

2.7. Colony formation assay

 $3x10^5$ HeLa cells were transfected with 1 µg of pcDNA vectors expressing HBx variants or with empty vector. Three days post-transfection, the cells were sub-cultured (1:10) and

selected with 500 μ g/ml of geneticin. Drug-resistant colonies appearing 10-15 days later were fixed and stained with 0,1 % crystal violet.

2.8. Antibodies and reagents

Anti-tubulin (dilution 1/10000 for western blot WB) was purchased from SIGMA (Catalog number T5168), anti-Flag (dilution 1/1000 for WB) was obtained from Sigma Aldrich (Catalog number F3165), anti-HA (dilution 1:200 for immunofluorescence IF and 1/5000 for WB) was purchased from Covance (Catalog number MMS 101R), anti-Smc5 (dilution 1/500 for WB) was from Santa Cruz Biotechnology (Catalog number sc-393282), anti-HBx (dilution1/500 for WB and for IF) was from Abcam (Catalog number ab39716), anti-DDBI (dilution 1/1000 for WB) was purchased from CliniSciences and used at 2 μ M for 24 h hours.

2.9. Immunoprecipitation and Western blot analysis

For immunoprecipitation, cells were lysed at 4°C in lysis buffer (400 mM KCl, 20 mM Tris pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 0,1% Triton X-100, 0,5 mM EDTA, 10% glycerol, 10 mM de β-mercaptoethanol, 0.5 mM PMSF) containing EDTA-free protease inhibitors cocktail (Roche). After lysis, the extracts were cleared by centrifugation (4°C, 13000 rpm, 20 min). Supernatant was then incubated with appropriate antibodies and beads for 2 h. Protein complexes bound to the beads were washed 3 times in lysis buffer and then eluted from the beads in loading buffer and analyzed by western blot. For Western blot analysis, samples were resolved by SDS-PAGE and electro-transferred to nitrocellulose membranes. After incubation with primary antibody, blots were probed with dye-conjugated secondary antibodies, and fluorescent immunoblot images were acquired using an Odyssey scanner (Li-CorBiosciences).

2.10. Immunofluorescence

HepaRG cells were grown on glass coverslips and transduced with normalized amounts of control lentiviral vector (TRIP Mock) or lentiviral vector encoding HA-tagged HBxwt or HA-tagged HBx variants. 48 h after transduction, cells were fixed with 4% paraformaldehyde (SIGMA) for 10 min at room temperature (RT). PFA-fixed cells were washed three times with PBS and permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS, for 5 min at RT. The samples were blocked in 5% BSA and 10% SVF and incubated for 1 h at RT with the primary antibody. After 8 washes in PBS containing 0.1% Tween 20, cells were incubated with a secondary antibody coupled to Alexa 488 (1:200) for 1 h at RT. Cells were then washed 8 times in PBS containing 0.1% Tween 20 and incubated for 10 min with diaminido phenyl indol (DAPI) for nuclear staining. Coverslips were mounted with Vectashield (Vector Laboratories). Fluorescent images were acquired on a Zeiss Axio Imager Z2 microscope with

Pln-Apo 63X/1.4 objectives. Images were acquired with ZEN blue 2012 software (Carl Zeiss,
Germany).

3. Results

3.1. Analysis of HBx variants encoded by HBV replicating virus present in tumor and non-tumor tissues

In a former study, we amplified and sequenced HBx encoded by episomal HBV DNA from 63 paired T and NT samples. To this aim, we amplified HBx sequence using nested PCR. We first amplified from total DNA extracted from paired T and NT the full-length HBV DNA using two external primers, followed by a nested PCR to amplify the HBx sequence (Gunther et al., 1995). To confirm that HBx was amplified from episomal DNA (RC-DNA or cccDNA) we also verified that HBx sequence could not be amplified by direct PCR using the internal HBx primers. Among the 63 paired NT and T we identified 11 patients showing genotypic differences between T and NT (Halgand et al., 2018). Among these 63 samples, we selected eight cases in which HBV cccDNA were present in both T and NT liver specimens and used cloning-sequencing to further study the activities of HBx from T and NT compartments. Five compartmentalized HBx samples (# 13, 29, 52, 67, 85 and 94) as well as three variants displaying the same genotype in T and NT were studied (Fig. 1). Cloningsequencing confirmed that the main HBV strains in T and NT were of different genotypes showing that a predominant quasispecies population is unambiguously identified in each compartment (Fig. 1). Since HBx sequence overlaps with the coding region of the viral polymerase (pol), we verified that these mutations do not introduce a stop codon in the pol ORF. Moreover HBx sequence, beside the pol region, overlaps with HBV regulatory regions: the negative regulatory element (NRE), the basic core promoter (BCP) and the enhancer II. We thus cannot exclude that these mutations would impact viral replication. For example, we identified HBx variants with "hot spots mutations" such as the K130M mutation alone or in combination with V131I that leads to mutation of the basal core promoter and consequently modifies its activity, or H94Y that introduces changes in the enhancer II (Kramvis and Kew, 1999; Lin and Kao, 2015).

Analyses of these HBx variants revealed the presence of twelve recurrent amino acid mutations between T and NT, which were detected in at least three cases, including A12S, C26R, S33P, R78C, S101P, L116V, K130M (Table 1). Our data confirm the high frequency of the K130M mutation described in chronic hepatitis and in HCC tissues, and its association with V131I mutation, as seen in samples # 13 and # 67 (Hsia et al., 1996; Takahashi et al., 1998; Venard et al., 2000). These mutations also affect the basal core promoter sequence and could enhance viral replication and participate in HCC development (Hussain et al., 2009; Li et al., 2013; Lin et al., 2005; Liu et al., 2014). We also noted a high frequency of S101P mutation in HCC (4 of 9 tumoral variants), which was shown to increase the proliferative action of HBx (Kwun and Jang, 2004). In addition, we observed recurrent mutations at positions 87 and 88, a recurrent spot of mutations in HCC (Chen et al., 2005; Wang et al., 2012).

3.2. Activation of HBV X- cccDNA transcription by HBx variants.

The main role of HBx is to allow and maintain HBV cccDNA transcription upon infection (Lucifora et al., 2011). Since HBx variants have been isolated from replicating HBV in T and NT tissues, we first tested whether these variants have conserved this activity and are thus able to rescue transcription of a virus deficient for HBx expression (HBV X-) in the context of infection. Differentiated HepaRG cells (dHepaRG) were infected for 7 days with HBVXand then transduced with a lentiviral vector coding for the different HA-tagged HBx variants. Analysis of the HBV RNA levels by qPCR four days post transduction showed that five out of the six compartmentalized tumor HBx studied, and six out of all the eight tumor HBx, have conserved the ability to rescue HBVX- (Fig. 2A and Table 1, "transactivation"). In the case of tumor #29, which contains two major HBx variants, one variant was able to rescue HBV X- while the other was deficient (Fig. 2A). However, some variants such as HBx T #52 and T#94 have reduced transcriptional activity. As expected, both HBx variants from T and NT in sample #76, which differ at only one amino acid, trans-complemented HBV X-. Finally, T HBx from samples #13 and #46 have lost the ability to activate HBV Xtranscription. Although the T and NT HBx mutants displayed variable expression levels, no correlation could be found between HBx expression and transcriptional activity, and similar results were obtained using an higher dose of lentiviral vectors (data not shown), which suggests that the level of HBx expression was not responsible for the lack of transcriptional activation. Altogether, these data show that HBV replication in HCC correlates with the emergence of HBx variants that are still able to support HBV transcription.

3.3. Analysis of CREB-dependent transcriptional activity of HBx variants

HBx has been shown to interact with CREB/ATF factors and increase their activity through the recruitment of CBP/P300 and the inhibition of PP1/HDAC1 (Cougot et al., 2012; Cougot et al., 2007; Williams and Andrisani, 1995). We therefore monitored the activity of HBx variants towards CREB responsive element using luciferase assay. HeLa cells were transfected with pCRE-luc reporter and PKA expression vector together with either wild type HBx (HBxwt) or HBx variants. As shown in Fig. 2B, all HBx variants could stimulate CREB-dependent transcription, with higher activity for some variants such as #29T1.

3.4. Smc5/6 degradation

Next, we assessed whether the ability of HBx variants to activate HBV transcription is associated to their ability to degrade Smc5/6, as shown recently (Decorsiere et al., 2016). We transduced HEK 293T cells or HepaRG cells with lentiviral vectors coding for the different HA-tagged HBx variants. As shown in Fig.3 A and B, all variants that conserved the ability to activate the transcription of HBV X- induced the degradation of Smc5 (#13 NT, # 29NT, # 29T1, # 46NT, # 52T, # 52NT, #67NT, #67T, #76NT, #76 T, #85 NT, #85T, #94NT, #94T).

Variants that lost the ability to activate cccDNA transcription were unable to degrade Smc5 (# 13T, #29T2, #46T).

The following question was whether the inability of three HBx variants: # 13T, #29T2 and #46T, to induce Smc5/6 degradation correlates with the loss of interaction with DDB1. To this aim, HeLa cells were transfected with Flag-DDB1 alone or in combination with different HA-tagged HBx variants, followed by immunoprecipitation using anti-HA antibodies. As shown in Fig. 3C, Flag-DDB1 was specifically immunoprecipitated with all the HBx variants tested. Our data show that the interaction of HBx variants with DDB1 is not altered, but suggests rather that these T HBx variants have lost their ability to interact with Smc5/6.

We therefore expressed wt HBx or HBx variants: # 13T, #29T2 and #46T in HEK 293T cells treated or not with MLN4924, an inhibitor of E3 ubiquitin Cullin RING ligases in order to stabilize Smc6, and assessed their interaction with endogenous Smc6 and DDB1 using immunoprecipitation (Fig. 3D and E). Our results confirm that wt HBx and T variants interact with endogenous DDB1. They also show that mutants that do not induce Smc6 degradation lose or decrease their interaction with Smc6 compared to wt HBx that interacts with Smc6 even in cells with low level of Smc6 due to its degradation (Fig. 3D).

3.5. Characterization of the growth-suppressive activity of the HBx variants

Previous studies have shown that HBx variants isolated from integrated HBV sequences in tumor tissues tend to lose their antiproliferative activities, a phenotype observed in hepatic and non hepatic cells (Tu et al., 2001). Using an established method, we assessed the growthsuppressive activity of the HBx variants (Li et al., 2010). HeLa cells were transfected with the different HA-tagged HBx variants expression plasmids. G418-resistant colonies were stained 15 days after transfection. As shown in Fig. 4, wt HBx expression strongly inhibits colony formation compared to the empty vector. Interestingly, of the 8 NT/T samples studied, 5 HBx variants from tumor tissues lost their antiproliferative activity (Summarized in Table 1, "growth suppression"). Once again, the two major HBx variants in tumor #29 showed opposite activities. Interestingly, when compared to Fig. 2A, the three HBx variants (ie #13T, #29T2 and #46T) that have lost the ability to activate the transcription of the HBV X- and to induce Smc5/6 degradation, have also lost their antiproliferative activity. However, two variants (#67 and #94) have lost growth suppressive activity but are still able to activate cccDNA transcription, suggesting that the two activities can be separated, as previously suggested (Tu et al., 2001). Notably, out of the 6 HBx T variants that were able to support HBV cccDNA transcription, 4 have maintained the antiproliferative activity suggesting that the two activities are strongly associated probably because they are both required for HBV replication. Indeed, all the HBx variants from the NT tissues transactivate HBV cccDNA and show growth suppressive activity. Western blot analysis showed that all HBx variants were expressed at similar levels in HeLa cells. In all five T variants that had lost their

antiproliferative activity, we identified a mutation at position 101. Among then, 4 HBx T variants present an S to P mutation (Table 1). All these variants contain also a methionine at aa 130. Interestingly, Kwun and Jang have suggested that the regulation of p21 expression by HBx and consequently the antiproliferative activity of HBx is controlled by two opposite activities regulated respectively by aa101 and aa130 of HBx. The presence of a serine at position 101 instead of a proline is thus linked to the stronger induction of p21 and to the antiproliferative activity of HBx while the presence of methionine at aa 130 is associated with the repression of p21 (Kwun and Jang, 2004).

3.6. Sub-cellular localization of HBx variants

HBx is localized both in the nucleus and in the cytoplasm in accordance with its different activities (Benhenda et al., 2009b; Slagle and Bouchard, 2016). We examined the cellular localization of HBx T variants and of their NT counterparts in order to determine whether the mutations affect sub-cellular localization. Like for wt HBx, we observed a dual nuclear and cytoplasmic localisation for the different HBx variants, suggesting that the modifications of HBx activities cannot be explained by different subcellular localization (Fig. 5).

4. Discussion

The data presented here show that most cases of HBV-replicating HCC harboured mutations in the X gene that do not impact the ability of HBx to support HBV transcription, (6 out of 9 T variants retain transcriptional activity) but they tend to interfere with the HBx antiproliferative activity (5 T variants out of 9 have lost antiproliferative activity). Importantly, we noted a strong correlation between the ability of HBx mutants to support HBV transcription in the setting of infection and their ability to induce Smc5/6 degradation. Mutants that have lost their ability to support HBV transcription are unable to induce the degradation of Smc5/6. These mutants are however still able to interact with DDB1 but they interact poorly or not at all with Smc6, suggesting that the mutation may rather affect Smc5/6 binding. While the minimal DDB1 interacting domain has been clearly identified and lies between position 88 and 100 in HBx, the regions binding Smc5/6 are still poorly defined (Li et al., 2010). Studies using HBx mutants have demonstrated that the transactivation function of HBx resides between amino acid 52 and 148 (Slagle and Bouchard, 2016). Interestingly, a deletion of 16 aa at HBx C-ter abolishes its transcriptional activity, suggesting that the C-ter domain might be important for Smc5/6 binding (Tu et al., 2001). The C-ter region adjoining DDB1 binding domain contains aa conserved among mammalian hepadnaviruses (Abdul et al., 2018). Interestingly, T HBx variants that have lost their ability to degrade Smc5/6 contain mutations in the C-terminal conserved region (Fig. 1). They however also contain changes in the region between aa 52 and aa 87 and we cannot exclude that this region also participates in

Smc5/6 binding. Further studies will be needed to delineate the domain of HBx involved in the recruitment of Smc5/6 and to test the impact of such mutations in the interaction.

We observed that T HBx variants have impaired antiproliferative activity. This feature has been reported previously for COOH-terminal deletion HBx variants but also for some variants found in tumors and containing amino acid changes (Lin et al., 2005; Tu et al., 2001). HBx has been shown to modulate cell cycle progression but the consequences vary depending of the cellular context. HBx induces cell cycle arrest at the G1/S transition, apoptosis and mitotic defects in proliferating cells (Bergametti et al., 1999; Martin-Lluesma et al., 2008; Sirma et al., 1999). On the contrary, in differentiated nonproliferating cells, HBx has no deleterious effect, but it seems to however stimulate quiescent hepatocytes to exit G0 and stall in G1. The same activity is observed when HBx is expressed from the HBV genome (Gearhart and Bouchard, 2010a, b). The emergence of such mutants may thus reflect adaptive mutations that are necessary to allow HBV replication in the tumor environment. A second non-exclusive hypothesis is that tumor development is due to oncogenic variants of HBx, which favour the transformation of infected hepatocytes. While controversial, HBx is believed to participate in cell transformation by a yet unknown mechanism but it is likely linked to its pleiotropic activities such as transcriptional activation, modulation of signal transduction pathway or degradation of cellular complex such as Smc5/6 that in turn impacts mitosis, DNA repair, response to genotoxic stress or apoptosis (Benhenda et al., 2009a; Livingston et al., 2017). Therefore, HBx might be involved in early stage of HCC development but then mutations/deletions arise in the X gene disrupting the antiproliferative activity in order to allow tumor cell expansion. A similar scenario is described for the viral protein Tax of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1). Tax, which plays a pivotal role in the development of adult T-cell leukemia/lymphoma (ALT), seems to be required in the early stage of oncogenesis but its expression is lost in leukemic cells of ALT. The loss of Tax expression in transformed cells is attributed to negative pressure exerted by the host immune system but also by the fact that expression of Tax induces cellular senescence (Giam and Semmes, 2016). On the other hand, HBx T mutants that have lost antiproliferative activity are believed to have acquired new oncogenic properties (Li et al., 2016; Tu et al., 2001; Xu et al., 2007). The mechanism underlying HBx tumor variants carcinogenesis has however not been elucidated but different mechanisms have been proposed. Studies have suggested that the first 50 aa at the N-terminal domain of HBx are required and sufficient for HBx-induced transformation (Gottlob et al., 1998). COOH-terminal deletions in HBx mutants have been shown to induce the expression of CENP-A by yet an unknown mechanism (Liu et al., 2012). Moreover the C-terminal domain can also be involved in cell proliferation and tumor development. Studies have shown that M130 mutation is associated with strong suppression of p21 expression (Kwun and Jang, 2004). The dual mutation K130M/V131I has been shown to increase HIF1a expression and activity (Liu et al., 2014). The emergence of point mutant variants could fine-tune the regulation of HBx activities,

keeping only activities compatible with cell proliferation and/or favouring cell growth. Further studies are needed to determine whether the T variants described here participate in cell transformation or in the maintenance of the transformed phenotype.

We observed that out of the six T variants that retained transcriptional activity, two (#94 and #67) have lost the antiproliferative activity suggesting that the two activities can be separated. The same was observed for mutants containing a C-terminal deletion of 14 aa (Tu et al., 2001). It has been shown that the interaction of HBx with DDB1 is required for both for transcriptional activation and antiproliferation activity (Leupin et al., 2005; Sitterlin et al., 2000). Recently Decorsière and collaborators have shown that HBx transcriptional activity is linked to its ability to induce the degradation of Smc5/6 through its interaction with DDB1 (Decorsiere et al., 2016). Since mutants #94 and #67 are still able to induce Smc5/6 degradation, one may hypothesise that HBx induces the degradation of additional substrate(s). Alternatively, mutations may affect the ability of HBx to interact with p53 or c-FLIP or any other pathway involved in HBx antiproliferative activity (Slagle and Bouchard, 2016). Further studies will be needed to uncover the function altered by these mutations.

Intriguingly, we observed that some replicating HBV genomes in tumors carry a transcriptionally inactive HBx protein (#13, #29, #46). While these observations i.e. HBV replication with non-functional HBx seem paradoxical, it is known that the requirement of HBx for HBV transcription is cell context-dependent. HBx is dispensable for HBV transcription in Huh7 cells while it is essential for the initiation and maintenance of transcription in HepG2 and HepaRG cells and in primary human hepatocytes (Leupin et al., 2005; Lucifora et al., 2011; Riviere et al., 2015a). It will be interesting to analyze whether Smc5/6 expression is down regulated in this HBV replicating HCC.

We previously showed that HBV-replicating HCCs are relatively well differentiated and non-invasive tumors (Halgand et al., 2018). We show here that these tumors contain transcriptionally active cccDNA that code for HBx variants with conserved transcriptional activity and ability to counteract Smc5/6. It will be interesting to investigate whether the degradation of Smc5/6 is involved in cellular transformation and more specifically, in the particular characteristics of HCC replicating HBV.

Acknowledgments. This work was supported by grants from Institut National du Cancer (INCa) and Agence Nationale de la Recherche sur le Sida et les Hépatites Virales (ANRS). L.R. was supported by INCa and by ANRS. BQS was supported by ANRS.

Author contributions: LR, CF, MAB and CN designed the study and analysed the data. CN and MAB wrote the manuscript. LR, BQS performed the experiments, with help from BH

and GF. All authors have read and approved the final manuscript. All authors declare no conflict of interest.

Legends

 Fig. 1: Amino acid sequences of NT and T HBx variants in 8 cases. Top: schematic representation of full-length HBx protein. The minimal binding domain for DDB1 is shown. KD, Kunitz domain-like region; PSR, proline-serine-rich domain. Sequences shown for NT and T samples represent the major sequence. For each case, the consensus sequences for each genotype are shown above the NT and T sequences with first, the consensus sequence for the T followed by the consensus sequence for the NT sample. Consensus sequences are from the Hepatitis B Virus Database (HBV db) (Hayer et al., 2013). Arrowhead indicates mutations in T and black dot indicates subgenotype variations.

Fig. 2. Comparison of transactivating activity of T and NT HBx variants. **A)** Transcomplementation of HBV X- transcription by T and NT HBx variants. dHepaRG cells were infected with HBVX- at MOI of 100 vp/cell. Seven days later, infected cells were transduced with a control lentiviral vector (empty) or the different lentiviral vector encoding HA-tagged HBx variants as indicated. Four days after transduction, HBV transcription was analyzed by RT-qPCR. Transcript level in cells transduced with TRIP Mock (empty) was set to 1. HA-HBx expression was analyzed by Western blot with anti-HA antibodies. Mean \pm SEM of 3 experiments are shown. *P* values were determined by Mann-Whitney test (*, *P* < 0.05).

B) Activation of CREB/ATF-dependent transcription by HBx variants. HeLa cells were cotransfected with pCRE-Luc reporter and RSV-PKA plasmids with different combinations of wild type HBx or T and NT HBx variants as indicated. Luciferase activities were determined 48 h after transfection. The basal activity of the cells co-transfected with pCRE-Luc and the PKA expression vector was set to 1. The results are the mean \pm SEM of three independent experiments carried out in duplicate. *P* values were determined by Mann-Whitney test (*, *P* < 0.05).

Fig. 3. Analysis of Smc5 protein levels in cells expressing HBx NT and T variants. Whole cell extracts from HEK293 (A) or from HepaRG cells (B), transduced with lentiviruses coding the different HA-tagged HBx variants or HA-tagged HBx wt or empty vector (mock) were analyzed by Western blot for Smc5 expression. HBx level was assessed using either anti-HA antibody or anti-HBx antibody as indicated. Of note the mutations present in variant # 94 seem to affect the recognition by the HBx antibody. Tubulin was used as loading control. (C) Co-immunoprecipitation of Flag-DDB1 with indicated HA-HBx variants using anti-HA antibodies in HeLa cells. Proteins in the immune complexes were revealed by Western blot with anti-Flag and HA antibodies. (D) and (E) HEK293 cells were transfected with either HA-tagged wt HBx or indicated HA-tagged HBx variants or empty vector (mock) and treated (E) or not (D) for 24 h with NLM4924. Cell extracts were immunoprecipitated using anti-HA antibodies. DDB1, Smc6 and HA-tagged HBx were detected by Western blot. Arrowhead indicates IgG light chain. Asterisk indicates non-specific band.

Fig. 4. Growth-suppressive effect of T and NT HBx variants. HeLa cells were transfected with pcDNA vectors containing the indicated HBx variants or with empty vector. HBx expression was analyzed by Western Blot three days after transfection using anti-HA antibody. Geneticin-resistant colonies were fixed and stained with crystal violet, two weeks after plating. The data are representative of at least two independent transfection experiments.

Fig. 5. Sub-cellular localization of HBx T and NT variants. HepaRG cells were transduced with lentiviruses coding the different HA-tagged HBx variants or HA-tagged HBx wt or empty vector (mock). After 48 h, cells were fixed and immunostained with anti-HA and anti-HBx antibodies. Scale bar: 10 μm.

Table 1. Mutations in T and NT HBx sequences: the 12 recurrent positions and HBx functional activities are indicated. Variations that can account for genotype/subgenotype difference are shown in blue while mutations are shown in red. Consensus sequences for each genotype as well as subgenotypic variability were from HBVdb (Hayer et al., 2013).

type	id	genotype	aa position in HBx										growth suppression	transactivation cccDNA	Smc5/6 degradation		
			12	26	31	33	78	87	88	101	116	130	132	151			0
NT	13	Α		R	S		С	Q	Ι	Р		K	F	L	+	++	+
Т		G		S	Р		Y	Η	Р	F		Μ	Y	F	-	-	-
NT	29	D	А	С		S	R			S	L			L	+	++	+
T1	İ	D	S	R		Р	R			S	V			F	+	++	+
T2		Α	S	R		Р	С			Р	V			L	-	-	-
NT	46	С						М		S			F		+	++	+
Т		С						Η		Р			Ι		-	-	-
NT	52	E	А	С		S	R				L	М	F	F	+	++	+
Т		Е	S	R		Р	С				V	Κ	Y	L	+	+	+
NT	67	D	Δ	С		S	R	R	М	S	Ĭ	K			+	++	+
T		A	S	R		P	C	Q	I	P	V	M			-	++	+
NT	76	A			S										+	++	+
Т		A			A										+	++	+
NT	85	D		С	S				R		L				+	++	+
Т		В		R	Р				Η		V				+	++	+
NT	94	D	А		S		R		F	S	L				+	++	+
Т	İ	Α	S		Α		С		Ι	Р	V				-	+	+

References

1206	
1207	Abdul, F., Filleton, F., Gerossier, L., Paturel, A., Hall, J., Strubin, M., Etienne, L., 2018.
1209	Smc5/6 Antagonism by HBx Is an Evolutionarily Conserved Function of Henatitis B Virus
1210	Infaction in Mommala, Journal of vinalogy 02
1211	infection in Manimais. Journal of Virology 92.
1212	Altinel, K., Hashimoto, K., Wei, Y., Neuveut, C., Gupta, I., Suzuki, A.M., Dos Santos, A.,
1213	Moreau, P., Xia, T., Kojima, S., Kato, S., Takikawa, Y., Hidaka, I., Shimizu, M., Matsuura,
1214	T., Tsubota, A., Ikeda, H., Nagoshi, S., Suzuki, H., Michel, M.L., Samuel, D., Buendia,
1216	M.A., Faivre, J., Carninci, P., 2016. Single-Nucleotide Resolution Mapping of Hepatitis B
1217	Virus Promoters in Infected Human Livers and Henatocellular Carcinoma Journal of
1218	virals as 00, 10011, 10022
1219	Virology 90, 10811-10822.
1220	Bai, F., Yano, Y., Fukumoto, T., Takebe, A., Tanaka, M., Kuramitsu, K., Anggorowati, N.,
1222	Rinonce, H.T., Widasari, D.I., Saito, M., Hirano, H., Hayakumo, T., Seo, Y., Azuma, T., Ku,
1223	Y., Hayashi, Y., 2013. Quantification of pregenomic RNA and covalently closed circular
1224	DNA in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. Int J Hepatol 2013, 849290.
1225	Belloni L. Pollicino T. De Nicola F. Guerrieri F. Raffa G. Fanciulli M. Raimondo G.
1220	Learner M. 2000. Nuclear IIDy kinds the IIDV minishremessome and modifies the
1228	Levrero, M., 2009. Nuclear HBX binds the HBV minichromosome and modifies the
1229	epigenetic regulation of cccDNA function. Proceedings of the National Academy of Sciences
1230	of the United States of America 106, 19975-19979.
1231	Benhenda, S., Cougot, D., Buendia, M.A., Neuveut, C., 2009a. Hepatitis B virus X protein
1232	molecular functions and its role in virus life cycle and pathogenesis. Adv Cancer Res 103,
1234	75-109.
1235	Benhenda S. Cougot D. Neuveut C. Buendia M.A. 2009h Liver cell transformation in
1236	shronia UDV infaction Viruses 1, 620,646
1237	chronic HBV infection. Viruses 1, 630-646.
1230	Benhenda, S., Ducroux, A., Riviere, L., Sobhian, B., Ward, M., Dion, S., Hantz, O., Protzer,
1240	U., Michel, M.L., Benkirane, M., Semmes, O.J., Buendia, M.A., Neuveut, C., 2013. The
1241	PRMT1 methyltransferase is a binding partner of HBx and a negative regulator of hepatitis B
1242	virus transcription. Journal of virology.
1243	Bergametti, F., Prigent, S., Luber, B., Benoit, A., Tiollais, P., Sarasin, A., Transv, C., 1999
1244	The program table of front of honotities P virus UP v protein correlates with its transportivation
1246	The proapoptotic effect of nepatitis B virus TBx protein correlates with its transactivation
1247	activity in stably transfected cell lines. Oncogene 18, 2860-28/1.
1248	Buendia, M.A., Neuveut, C., 2015. Hepatocellular carcinoma. Cold Spring Harb Perspect
1249	Med 5, a021444.
1250	Cairo, S., Armengol, C., De Reynies, A., Wei, Y., Thomas, E., Renard, C.A., Goga, A.,
1252	Balakrishnan, A., Semeraro, M., Gresh, L., Pontoglio, M., Strick-Marchand, H., Levillayer,
1253	F Nouet Y Rickman D Gauthier F Branchereau S Brugieres L Laithier V
1254	Douvier D. Domon F. Dosso C. Michiels I.F. Hofmon D. Ashow Cindre F. Lawer H.
1255	Douvier, N., Doman, F., Dasso, G., Michels, J.F., Holman, F., Arbez-Gindre, F., Jouan, H.,
1250	Kousselet-Chapeau, M.C., Berrebi, D., Marcellin, L., Plenat, F., Zachar, D., Joubert, M.,

1261	
1262	
1203	Selves, J., Pasquier, D., Bioulac-Sage, P., Grotzer, M., Childs, M., Fabre, M., Buendia, M.A.,
1265	2008. Hepatic stem-like phenotype and interplay of Wnt/beta-catenin and Myc signaling in
1266	aggressive childhood liver cancer. Cancer cell 14, 471-484.
1207	Chen, G.G., Li, M.Y., Ho, R.L., Chak, E.C., Lau, W.Y., Lai, P.B., 2005. Identification of
1269	henatitis B virus X gene mutation in Hong Kong natients with henatocellular carcinoma. I
1270	Clin Virus A 7 12
1271	Clin virol 34, 7-12.
1272	Cougot, D., Allemand, E., Riviere, L., Benhenda, S., Duroure, K., Levillayer, F., Muchardt,
1273	C., Buendia, M.A., Neuveut, C., 2012. Inhibition of PP1 Phosphatase Activity by HBx: A
1274	Mechanism for the Activation of Hepatitis B Virus Transcription. Sci Signal 5, ra1.
1276	Cougot, D., Wu, Y., Cairo, S., Caramel, J., Renard, C.A., Levy, L., Buendia, M.A., Neuveut,
1277	C., 2007. The hepatitis B virus X protein functionally interacts with CREB-binding
1270	protein/p300 in the regulation of CREB-mediated transcription. The Journal of biological
1280	chemistry 282, 4277-4287.
1281	Decorsiere, A., Mueller, H., van Breugel, P.C., Abdul, F., Gerossier, L., Beran, R.K.,
1282	Livingston C.M. Niu C. Eletcher S.P. Hantz O. Strubin M. 2016 Henatitis B. virus X
1284	nestein identifies the Sme5/(complex of a heat restriction factor Networe 521, 296, 290
1285	protein identifies the Smc5/6 complex as a nost restriction factor. Nature 531, 386-389.
1286	Ducroux, A., Benhenda, S., Riviere, L., Semmes, O.J., Benkirane, M., Neuveut, C., 2014.
1287	The Tudor domain protein Spindlin1 is involved in intrinsic antiviral defense against
1288	incoming hepatitis B Virus and herpes simplex virus type 1. PLoS pathogens 10, e1004343.
1290	Faria, L.C., Gigou, M., Roque-Afonso, A.M., Sebagh, M., Roche, B., Fallot, G., Ferrari, T.C.,
1291	Guettier, C., Dussaix, E., Castaing, D., Brechot, C., Samuel, D., 2008. Hepatocellular
1292	carcinoma is associated with an increased risk of hepatitis B virus recurrence after liver
1294	transplantation. Gastroenterology 134, 1890-1899; quiz 2155.
1295	Gearhart, T.L., Bouchard, M.J., 2010a. The hepatitis B virus X protein modulates hepatocyte
1296 1297	proliferation pathways to stimulate viral replication. Journal of virology 84, 2675-2686.
1298	Gearhart, T.L., Bouchard, M.J., 2010b. Replication of the hepatitis B virus requires a
1299	calcium-dependent HBx-induced G1 phase arrest of hepatocytes. Virology 407, 14-25.
1300	Giam C.Z. Semmes O.L. 2016 HTLV-1 Infection and Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma-
1302	A Tale of Two Drotains: Tay and HD7 Viruses 8
1303	A fale of two Flotenis. Tax and HBZ. viruses 8.
1304	Gottlob, K., Pagano, S., Levrero, M., Graessmann, A., 1998. Hepatitis B virus X protein
1305	transcription activation domains are neither required nor sufficient for cell transformation.
1307	Cancer research 58, 3566-3570.
1308	Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaise, D., Cannie, I., Guyomard, C., Lucas,
1309	J., Trepo, C., Guguen-Guillouzo, C., 2002. Infection of a human hepatoma cell line by
1311	hepatitis B virus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of
1312	America 99, 15655-15660.
1313	Gunther, S., Li, B.C., Miska, S., Kruger, D.H., Meisel, H., Will, H., 1995, A novel method
1314	for efficient amplification of whole hensitis R virus genomes normits ranid functional
1315	for enterent amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional
1317	
1318	
1319	

1321	
1322	
1323	analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. Journal of virology 69,
1324	5437-5444
1326	Helgend D. Destantes C. Diviena I. Fallet C. Sahaah M. Calderona I. Diovlas Saga D.
1327	Halgalid, B., Desterke, C., Kiviere, L., Fallot, G., Sebagli, W., Calderaro, J., Biourac-Sage, F.,
1328	Neuveut, C., Buendia, M.A., Samuel, D., Feray, C., 2018. Hepatitis B Virus Pregenomic
1329	RNA in Hepatocellular Carcinoma: A Nosological and Prognostic Determinant. Hepatology
1330	(Baltimore, Md 67, 86-96.
1332	Haver, J., Jadeau, F., Deleage, G., Kay, A., Zoulim, F., Combet, C., 2013, HBVdb: a
1333	knowledge database for Henatitis B Virus, Nucleic acids research 41, D566-570
1334	Lie C.C. Varyan II. Takan E. 1006 Hat and mutations in heastidis D virus V and in
1335	Hsia, C.C., Yuwen, H., Tabor, E., 1996. Hot-spot mutations in nepatitis B virus X gene in
1336	hepatocellular carcinoma. Lancet 348, 625-626.
1338	Hussain, Z., Jung, H.S., Ryu, D.K., Ryu, W.S., 2009. Genetic dissection of naturally
1339	occurring basal core promoter mutations of hepatitis B virus reveals a silent phenotype in the
1340	overlapping X gene. The Journal of general virology 90, 2272-2281.
1341	Keasler VV Hodgson A I Madden C R Slagle B L 2007 Enhancement of henatitis B
1342	virus replication by the regulatory V protein in vitro and in vivo. Journal of virology 81
1344	
1345	2656-2662.
1346	Kramvis, A., Kew, M.C., 1999. The core promoter of hepatitis B virus. Journal of viral
1347	hepatitis 6, 415-427.
1348	Kwun, H.J., Jang, K.L., 2004. Natural variants of hepatitis B virus X protein have differential
1350	effects on the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene. Nucleic acids
1351	research 32, 2202-2213.
1352	Leupin, O., Bontron, S., Schaeffer, C., Strubin, M., 2005, Hepatitis B virus X protein
1353	stimulates viral genome replication via a DDB1_dependent pathway distinct from that leading
1355	stimulates vital genome represention via a DDD1-dependent pathway distinct from that reading
1356	to cell death. J Virol. 79, 4238-4245.
1357	Li, T., Robert, E.I., van Breugel, P.C., Strubin, M., Zheng, N., 2010. A promiscuous alpha-
1358	helical motif anchors viral hijackers and substrate receptors to the CUL4-DDB1 ubiquitin
1360	ligase machinery. Nat Struct Mol Biol 17, 105-111.
1361	Li, W., Chen, G., Yu, X., Shi, Y., Peng, M., Wei, J., 2013. Accumulation of the mutations in
1362	basal core promoter of hepatitis B virus subgenotype C1 increase the risk of hepatocellular
1363	carcinoma in Southern China. Int I Clin Exp. Pathol 6, 1076-1085
1364	Li W Li M Lizz D Ly X Cy X Zhang O Zhang Z Li H 2016 Combouyl
1366	LI, W., LI, M., LIAO, D., LU, A., GU, A., Zhang, Q., Zhang, Z., LI, H., 2010. Carboxyl-
1367	terminal truncated HBx contributes to invasion and metastasis via deregulating metastasis
1368	suppressors in hepatocellular carcinoma. Oncotarget 7, 55110-55127.
1369	Lin, C.L., Kao, J.H., 2015. Hepatitis B virus genotypes and variants. Cold Spring Harb
1370	Perspect Med 5, a021436.
1372	Lin, X., Xu, X., Huang, Q.L., Liu, Y.Q., Zheng, D.L., Chen, W.N., Lin, J.Y., 2005.
1373	Biological impacts of "hot-spot" mutations of hepatitis B virus X proteins are genotype B and
1374	C differentiated World I Gastroenterol 11 A703_A708
1375	
1377	
1378	

1382	
1383	Liu, L., Li, Y., Zhang, S., Yu, D., Zhu, M., 2012, Hepatitis B virus X protein mutant
1384	unregulates CENP-A expression in henatoma cells. Oncol Rep 27, 168-173
1386	Lize L. D. Lize D. C. V. C. Liz, D.L. Char, C.C. Liz, D.D. 2014, UD-1995.
1387	Liu, L.P., Hu, B.G., Ye, C., Ho, K.L., Chen, G.G., Lai, P.B., 2014. HBX mutants
1388	differentially affect the activation of hypoxia-inducible factor-1alpha in hepatocellular
1389	carcinoma. Br J Cancer 110, 1066-1073.
1390	Liu, X.H., Lin, J., Zhang, S.H., Zhang, S.M., Feitelson, M.A., Gao, H.J., Zhu, M.H., 2008.
1392	COOH-terminal deletion of HBx gene is a frequent event in HBV-associated hepatocellular
1393	carcinoma World I Gastroenterol 14 1346-1352
1394	Livingston C.M. Ramakrishnan D. Strubin M. Eletcher S.P. Beran P.K. 2017
1395	Livingston, C.M., Kamakrishnan, D., Sudoli, W., Ficturer, S.F., Beran, K.K., 2017.
1390	Identifying and Characterizing Interplay between Hepatitis B virus X Protein and Smc5/6.
1398	Viruses 9.
1399	Lucifora, J., Arzberger, S., Durantel, D., Belloni, L., Strubin, M., Levrero, M., Zoulim, F.,
1400	Hantz, O., Protzer, U., 2011. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain
1401 1402	virus replication after infection. Journal of hepatology.
1403	Marchio, A., Cerapio, J.P., Ruiz, E., Cano, L., Casavilca, S., Terris, B., Deharo, E., Dejean,
1404	A., Bertani, S., Pineau, P., 2018, Early-onset liver cancer in South America associates with
1405	low henstitis B virus DNA burden Sci Ren 8 12031
1406 1407	Martin Lharma S. Schaffer C. Dahart F.L. van Dravael D.C. Lawin O. Hartz O.
1408	Martin-Liuesma, S., Schaener, C., Robert, E.I., Van Breuger, P.C., Leupin, O., Hantz, O.,
1409	Strubin, M., 2008. Hepatitis B virus X protein affects S phase progression leading to
1410	chromosome segregation defects by binding to damaged DNA binding protein 1. Hepatology
1411 1/12	(Baltimore, Md 48, 1467-1476.
1413	Maurer, R.A., 1989. Both isoforms of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit
1414	can activate transcription of the prolactin gene. The Journal of biological chemistry 264,
1415	6870-6873.
1416 1417	Riviere, L., Ducroux, A., Buendia, M.A., 2013, The oncogenic role of hepatitis B virus
1418	Recent Results Cancer Res 103 50-74
1419	Recent Results Cancer Res 175, 57-74.
1420	Riviere, L., Gerossier, L., Ducroux, A., Dion, S., Deng, Q., Michel, M.L., Buendia, M.A.,
1421	Hantz, O., Neuveut, C., 2015a. HBx relieves chromatin-mediated transcriptional repression
1422	of hepatitis B viral cccDNA involving SETDB1 histone methyltransferase. Journal of
1424	hepatology 63, 1093-1102.
1425	Riviere, L., Gerossier, L., Ducroux, A., Dion, S., Deng, Q., Michel, M.L., Buendia, M.A.,
1426	Hantz, O., Neuveut, C., 2015b. HBx relieves chromatin-mediated transcriptional repression
1427	of hepatitis B viral cccDNA involving SETDB1 histone methyltransferase. Journal of
1429	henatology
1430	Season C. Mason W.S. 2015 Molecular hieless of honotitic Prvinus infection. Virology
1431	seeger, C., Mason, W.S., 2013. Molecular biology of nepatitis B virus infection. Virology
1432	4/9-480, 6/2-686.
1434	Sirma, H., Giannini, C., Poussin, K., Paterlini, P., Kremsdorf, D., Brechot, C., 1999. Hepatitis
1435	B virus X mutants, present in hepatocellular carcinoma tissue abrogate both the
1436	antiproliferative and transactivation effects of HBx. Oncogene 18, 4848-4859.
1437 1438	
1439	
1440	

1442	
1443	Sitterlin D. Bergametti F. Transv. C. 2000 UVDDB p127-binding modulates activities
1444	Sitterini, D., Dergametri, T., Transy, C., 2000. $O'DDD' P127' ondering inordinates activities$
1445	and intracellular distribution of nepatitis B virus X protein. Oncogene 19, 441/-4426.
1440	Slagle, B.L., Bouchard, M.J., 2016. Hepatitis B Virus X and Regulation of Viral Gene
1448	Expression. Cold Spring Harb Perspect Med 6, a021402.
1449	Sung, W.K., Zheng, H., Li, S., Chen, R., Liu, X., Li, Y., Lee, N.P., Lee, W.H., Ariyaratne,
1450	PN Tennakoon C Mulawadi FH Wong KF Liu AM Poon RT Fan ST Chan
1451	KI, Cong Z, Iby V, Lin Z, Wang C, Zhang O, Darbar TD, Chay WC, Agagravel
1452	K.L., Gong, Z., Hu, T., Lin, Z., Wang, G., Zhang, Q., Barber, T.D., Chou, W.C., Aggarwai,
1454	A., Hao, K., Zhou, W., Zhang, C., Hardwick, J., Buser, C., Xu, J., Kan, Z., Dai, H., Mao, M.,
1455	Reinhard, C., Wang, J., Luk, J.M., 2012. Genome-wide survey of recurrent HBV integration
1456	in hepatocellular carcinoma. Nature genetics 44, 765-769.
1457 1458	Takahashi, K., Akahane, Y., Hino, K., Ohta, Y., Mishiro, S., 1998. Hepatitis B virus genomic
1459	sequence in the circulation of hepatocellular carcinoma patients: comparative analysis of 40
1460	full-length isolates. Arch Virol 143, 2313-2326.
1461	Tang H Delgermaa I Huang F Oishi N Liu I He F Zhao I Murakami S 2005
1462	The transmitting of the section of LD- section is in sector for the sector of the sect
1463	The transcriptional transactivation function of HBx protein is important for its augmentation
1465	role in hepatitis B virus replication. J Virol. 79, 5548-5556.
1466	Tu, H., Bonura, C., Giannini, C., Mouly, H., Soussan, P., Kew, M., Paterlini-Brechot, P.,
1467	Brechot, C., Kremsdorf, D., 2001. Biological impact of natural COOH-terminal deletions of
1468	hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma tissues. Cancer research 61, 7803-
1469	7810
1471	Venard V. Corsaro D. Kaizer C. Bronowicki I.P. Le Faou A. 2000 Henatitis B. virus V.
1472	Venard, V., Corsaro, D., Kajzer, C., Bronowicki, J.I., Le Paou, A., 2000. Repairus D virus X
1473	gene variability in French-born patients with chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma.
1474	Journal of medical virology 62, 177-184.
1475	Wang, Q., Zhang, T., Ye, L., Wang, W., Zhang, X., 2012. Analysis of hepatitis B virus X
1477	gene (HBx) mutants in tissues of patients suffered from hepatocellular carcinoma in China.
1478	Cancer Epidemiol 36, 369-374.
1479 1480	Williams, J.S., Andrisani, O.M., 1995. The hepatitis B virus X protein targets the basic
1480	region-leucine zipper domain of CREB. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 3819-3823.
1482	Xu R. Zhang X. Zhang W. Fang V. Zheng S. Vu X.F. 2007 Association of human
1483	ADODEC2 anti-line description and the expertise of the stitle size D result on multiplication of the state of
1484	APOBEC3 cytidine deaminases with the generation of nepatitis virus B x antigen mutants
1485	and hepatocellular carcinoma. Hepatology (Baltimore, Md 46, 1810-1820.
1487	Zoulim, F., Saputelli, J., Seeger, C., 1994. Woodchuck hepatitis virus X protein is required
1488	for viral infection in vivo. J. Virol. 68, 2026-2030.
1489	
1490	
1491 1492	
1493	
1494	
1495	
1496	
1497 1498	
1499	
1500	

HBx	PSR KD KD
	88 100
	DDB1
G consensus A consensus #13 T	100 100 120 1
A consensus D consensus MT #29 T1 T2	10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150
^{C consensus} #46 T	10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 V A P P. T D
E consensus #52 NT T	10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150
A consensus D consensus #67 T	10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150
A consensus #76 T	10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150
B consensus D consensus #85 T	10 20 30 43 55 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150
A consensus D consensus #94 T	10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 159









HA

•





Figure 3

A)












Figure 5