N°d'ordre NNT : xxx

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale ED BMIC 340
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

Spécialité de doctorat :
Discipline : Virologie et Biologie Cellulaire

Soutenue publiquement le 03 octobre 2017, par :
Laetitia GEROSSIER

L'influence de HBx sur la réplication du virus de l'Hépatite B et les conséquences sur la cellule

Devant le jury composé de :

M. Pr MERLE, Philippe / PU-PH / UCBL HCL	Président du jury
M. Dr SOUSSAN Patrick / MCU-PH / CIMI Paris	Rapporteur
M. Dr SUREAU Camile / DR INSERM / INTS, Paris	Rapporteur
M. Dr LOMONTE Patrick / DR CNRS / INMG Lyon	Examinateur
Mme. Dr KREMSDORF Dina / DR INSERM / CIMI Paris	Examinatrice
Mme. ZUCMAN-ROSSI Jessica / PU / Paris	Examinatrice
M. Dr HANTZ Olivier / CR CNRS / CRCL Lyon	Directeur de thèse
Mme. Dr CHEMIN Isabelle / DR INSERM / CRCL Lyon	Co-directrice de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. le Professeur Frédéric FLEURY**
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directrice Générale des Services	Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur G.RODE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. X. PERROT
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E.PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

Résumé

L'influence de HBx sur la réplication du virus de l'Hépatite B et les conséquences sur la cellule

L'infection par le virus de l'hépatite B (HBV) est problème majeur de santé publique mondial car (i) en dépit d'un vaccin efficace plus de 240 millions de personnes sont infectées de façon chronique par HBV, (ii) les traitements curatifs actuels ne permettent pas l'élimination complète de l'ADN viral. Ainsi, les individus infectés ont un risque accru de développer un carcinome hépatocellulaire (CHC). Comprendre les mécanismes de réplication du virus et son rôle dans la survenue du CHC reste un enjeu majeur.

Le rôle de la protéine HBx dans l'infection par HBV et l'oncogenèse viro-induite, reste mal connu, malgré un grand nombre de publications, car les fonctions décrites jusqu'alors sont limitées à des contextes d'études particuliers, souvent loin des conditions physiologiques.

Mes travaux de thèse reposent sur l'utilisation de modèles d'études proches de la physiologie naturelle d'une infection par HBV, notamment des cellules primaires infectables *in vitro*. J'ai pu démontrer lors de mon étude que HBx est indispensable à la réplication de HBV, et qu'il agit essentiellement via son interaction avec DDB1 pour contrer la restriction du virus due au complexe SMC5/6, en induisant sa dégradation. Ce facteur de restriction permet de bloquer la transcription de l'ADN viral au niveau épigénétique. Ce nouveau rôle inattendu de SMC5/6 ouvre de nombreux axes de recherche, notamment sur les mécanismes de restriction des virus à ADN épisomal.

SMC5/6 est connu pour son implication dans les voies de réparation de l'ADN : la dernière partie de ce manuscrit montre que sa dégradation dans les cellules infectées, altère ces mécanismes et sensibilise les cellules aux dommages à l'ADN, induits notamment par la radiothérapie. La présence de HBx dans les CHC pourrait ainsi s'avérer un atout pour le traitement du CHC.

Mots clés

Hépatite B, HBx, SMC5/6, Facteurs de restriction, Réplication virale, Carcinome Hépatocellulaire

Abstract

The influence of HBx on Hepatitis B virus replication and its cellular consequences

Hepatitis B virus (HBV) infection is a major health problem worldwide as (1) despite an effective preventive vaccine over 240 million individuals are chronically infected and (2) the actual viral suppressive treatments available do not eliminate viral DNA from cells. Thus, infected individuals are at a high risk of developing hepatocellular carcinoma (HCC) and understanding viral replication mechanisms and how it impacts on hepatocarcinogenesis is a major challenge.

The role of the HBx protein, notably in viral replication and oncogenic processes, is the subject of many publications. However, many studies have often used non-physiological infection conditions. My thesis project has addressed these limitations by using cellular models, including primary human hepatocytes which can be infected by HBV, to investigate HBx's role in these processes. I have shown that HBx is indispensable for HBV replication and that HBx associates with the infected cell's DDB1/ E3 ubiquitin complex to target its Smc5/6 complex for degradation via the proteasome. These studies have identified that the Smc5/6 complex is a novel viral restriction factor that acts at an epigenetic level to block viral replication. This unexpected role of SMC5/6 has led to new research into the evolutionary conservation of restriction factors for episomal DNA viruses.

As SMC5/6 is implicated in DNA Damage Repair (DDR), the last section of my thesis reports how SMC5/6 degradation in infected cells can sensitise cells to the cell killing effects of DNA damaging agents such as ionizing radiation and hydroxyurea. These results open-up possibilities for HCC treatment where HBx expression may be of therapeutic benefit.

Keywords

Hepatitis B, HBx, SMC5/6, host restriction factor, viral replication, hepatocellular carcinoma

Remerciements

Je tiens à remercier comme il se doit les membres du jury : les rapporteurs, Mr **Patrick Soussan** et Mr **Camille Sureau** d'avoir accepté de relire et corriger mon manuscrit pendant l'été ; les examinateurs, Mme **Dina Kremsdorf**, Mme **Jessica Zucman-Rossi** et Mr **Patrick Lomonte** d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci également aux membres de mon comité de suivi de thèse, Mme **Dina Kremsdorf** et Mr **Frédéric Catez** pour leurs conseils tout au long de ces 4 années de thèse.

Je remercie bien évidemment **Philippe Merle** et **Isabelle Chemin** pour leur accueil dans l'équipe Hépatocarcinogénèse et Infection Virales du CRCL pour leurs aide et conseils tout au long de ces 4 années.

Je tiens à remercier tout particulièrement **Olivier Hantz**, mon directeur de thèse. Sans lui, rien de tout cela n'aurait été possible. Merci de m'avoir transmis vos connaissances, merci de m'avoir si bien accueillie dans ce laboratoire et de m'avoir permis de réaliser cette thèse, merci pour votre aide et votre temps, merci de vos réponses même depuis le sud de la France.
Un immense merci également à **Janet Hall** pour son aide et son encadrement lors de cette dernière année de thèse. Merci pour les petits déjeuners au labo lors des irradiations bien trop matinales. Merci pour ta bonne humeur qui égaye notre annexe !

Merci à toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance de collaborer pour mener à bien cette thèse, **Christine Neuveut**, **Michel Strubin**, **Fabien Abdul**, **Adrien Decorsière**, **Lucie Etienne** et **Fabien Filleton**. Nos échanges m'auront beaucoup apporté.

Pour leur aide dans le travail au quotidien merci à notre petite équipe DDR qui a pris le temps de plater, traiter, irradier, fixer et compter des 10aines, non des 100aines de petites flasks : **Loïc, Alexia, Anaëlle et Janet** !!

Comment ne pas remercier les membres du CAT présents ou passés qui m'ont permis d'avancer dans ces travaux de par leur aide, leur soutien ou simplement des discussions et des encouragements : **Lydie, Elodie, Patricia, Natali, Dulce, Nathalie 1, Maëllen, Maud, Judith, Marie-Laure, Barbara, Jessica, Noémie, Célia, Nora, Clément, Marc, Thomas, Adrien, Mom's et Marie-Agnès** (sans qui nous serions bien perdus dans ce laboratoire !)

Je ferais donc un paragraphe à part pour remercier ceux qui au quotidien font que les journées soient moins compliquées et qui sont là pour les moments de doutes et de blues, pour leurs rires, leurs soutiens, leurs aides : **Les annexiens** ! En particulier, notre bureau de « filles » avec **Maëlle, Fleur, Aurore, Léa** ! Merci les filles pour la bonne ambiance de ce bureau, je retiendrais votre soutien et les sessions musique Disney !, et merci à **Fleur** pour la relecture du manuscrit ! Merci à **Nadim** pour les années passées en ta compagnie, toi et tes blagues vous nous manquez beaucoup depuis votre départ. **Alexia**, merci pour ton aide dans mon travail, merci d'avoir été la stagiaire idéale, je te souhaite vraiment le meilleur pour la suite. Et tous les autres annexiens avec qui j'ai pu partager un repas, une soirée ou un thé (je m'excuse par avance si j'en oublie quelques-uns !), **Loïc, Damien, Ludo, Emma, Laura, Hélène, Océane, Jennifer, Brieux, Romain, Anaëlle**...
Finalement même si en général je « n'aime pas les gens », vous je vous aime bien !!

Et puis, parce que j'ai pas le choix (pas le cœur non plus :-)) je remercie **ma Susu**, pour toutes nos conversations et nos partages en espérant que la fin de thèse ne signe pas la fin de notre amitié !

Merci à ma famille pour leur soutien et leur aide pour mes études et pour tout le reste ! Merci à ma belle-famille pour votre soutien et votre présence dans ma vie, merci en particulier à **Alain** et **Marion** pour la correction du manuscrit ! Des dédicaces particulières à ma pitchoune, **Clémence**.

Et enfin je remercie de tout mon cœur, mon doudou, **Julien**, de m'avoir supportée, aidée et soutenue depuis de longues années. Une étape se termine dans nos vies mais il nous reste encore de très grands projets à partager dans les mois et années à venir ! ;-)

Table des matières

PARTIE 1 Le virus HBV

I. Le virus de l'hépatite B 22
I.1. L'infection 22
I.1.1. Epidémiologie 22
I.1.2. Modes de transmission 24
I.1.3. Symptômes 24
I.1.4. Diagnostic 26
I.1.5. Evolution de l'infection par HBV 26
I.1.6. Traitements 30
I.1.7. Prévention 32
I.2. Les caractéristiques du virus HBV 32
I.2.1. La composition du virus 34
I.2.2. Cycle de réplication 42
I.3. Le minichromosome viral : l'ADNccc 46
I.3.1. La formation de l'ADNccc 46
I.3.2. La composition de l'ADNccc 48
I.3.3. La régulation de l'activité de l'ADNccc 50
I.4. Modèles d'étude pour HBV 54
I.4.1. Les modèles animaux 54
I.4.2. Production de particules virales 58
I.4.3. Modèles cellulaires 60

II. La protéine HBx 66
II.1. Structure 66
II.2. Nécessité de HBx pour la réplication 68
II.2.1. HBx permet la régulation de gènes indispensables à la réplication du virus 70
II.2.2. HBx régule l'ADNccc au niveau épigénétique 72
II.2.3. L'interaction avec DDB1 nécessaire à la réplication du virus 74
II.3. Implication de HBx dans l'oncogenèse 76

PARTIE 2 L'oncogénèse viro-induite

III. Cancer Hépatocellulaire (CHC) 78
III.1. Epidémiologie 80
III.2. Étiologie et facteurs de risques 80
III.2.1. La cirrhose 82
III.2.2. Les CHC d'origine virale 84
III.2.3. Les CHC d'origine toxique 86
III.2.4. Les CHC d'origine métabolique 88
III.3. Oncogenèse hépatique 92
III.4. Diagnostic, Suivi et Traitements 98
III.4.1. Dépistage 98
III.4.2. Diagnostic 98
III.4.3. Traitements à visée curative 100
III.4.4. Les traitements à visée palliative 102
III.4.5. Une nouvelle approche : La radiothérapie pour le traitement des CHC 104

IV. L'implication de HBV dans le CHC 108
IV.1. Intégration de l'ADN viral 110
IV.2. Instabilité génétique 110
IV.3. Rôle des protéines virales 112

IV.3.1. Les protéines de surfaces HBs et leurs mutations/délétions. 112
IV.3.2. La protéine HBx 114

Résultats

V. Objectifs des travaux de thèse 124

VI. Etude 1 : Implication de HBx dans la régulation épigénétique de l'ADNccc 128

128
VI.1. Introduction de l'étude 1 128
VI.2. Nos travaux 130
VI.3. Article 130
VI.4. Discussion de l'étude 1 140

VII. Travaux 2 : Identification de SMC5/6 en tant que facteur de restriction dégradé par HBx 142

142
VII.1. Introduction de l'étude 2 142
VII.1.1. Interaction entre les virus et les mécanismes d'ubiquitination 142
VII.1.2. Nos travaux 148
VII.2. Article 149
VII.3. Discussion étude 2 172
VII.3.1. Description du complexe SMC5/6 174
VII.3.2. SMC5/6, facteur de restriction ? 178
VII.3.3. Mécanismes mis en jeu lors de l'inhibition par SMC5/6 186
VII.3.4. Conséquences cellulaires de la dégradation de SMC5/6 190

VIII. Travaux 3 : Implication de la dégradation de SMC5/6 dans les mécanismes de réparation de l'ADN. 198
VIII.2. Introduction 200
VIII.2.1. Les différentes voies de réparations de l'ADN 200
VIII.2.2. PARP 204
VIII.3. Résultats 210
VIII.3.1. L'absence de SMC6 altère la réparation des cellules à la suite de dommages à l'ADN causés par les radiations ionisantes 210
VIII.3.2. Le stress réplicatif engendré par le traitement à l'hydroxyurée est délétère pour les cellules exprimant HBx 212
VIII.3.3. L'utilisation des inhibiteurs de PARP et le principe de la létalité synthétique 216
VIII.3.4. Radiations ionisantes et inhibiteurs de PARP une combinaison au profit du traitement des CHC ? 220
VIII.4. Discussion 224

Discussion Générale
Annexes
Bibliographie

Liste des Figures

Figure 1 Prévalence mondiale de l'infection par le virus de l'hépatite B de 1957 à 2013 23
Figure 2 Evolution naturelle de l'infection chronique par le virus de l'hépatite B 27
Figure 3 Comparaison des profils sérologiques des infections aiguës et chroniques 27
Figure 4 Pourcentages de résistance observés en fonction des différents traitements 29
Figure 5 Représentation du génome de HBV 33
Figure 6 Les protéines d'enveloppe de HBV 35
Figure 7 Topologie membranaire des protéines HBs 35
Figure 8 Représentation schématique des séquences des protéines HBc/PréC/HBe 37
Figure 9 Représentation de la séquence de la polymérase de HBV 37
Figure 10 Représentation schématique de la production de HBSP suite à l'épissage de l'ARNpg 39
Figure 11 Les différentes particules virales et subvirales 39
Figure 12 Cycle de réplication du virus HBV 41
Figure 13 Schématisation de la conversion de l'ADNrc en minichromosome viral 47
Figure 14 Image au microscope électronique de l'ADNccc 47
Figure 15 Régulation épigénétique de l'ADNccc 49
Figure 16 Avantages et inconvénients des différents modèles de souris 55
Figure 17 Résumé des cellules humaines les plus couramment utilisées pour étudier l'infection par HBV 59
Figure 18 Photographie de PHH en culture 59
Figure 19 Culture de cellules HepaRG à différents stades de différenciation 61
Figure 20 Rôle de HBx dans la réplication de HBV et le développement du CHC 65
Figure 21 Représentation de la séquence de HBx 65
Figure 22 Effet régulateur de HBx : une multitude de candidats. 69
Figure 23 Représentation de l'ADNccc, ses modifications épigénétiques et ses protéines associées en présence ou en absence de HBx 71
Figure 24 Description de l'association entre HBx et DDB1 73
Figure 25 Cartes des répartitions mondiales du taux d'incidence et de mortalité du cancer du foie. 77
Figure 26 Répartition des 10 cancers les plus courants 79
Figure 27 Facteurs de risques associés au CHC en fonction des régions du monde. 81
Figure 28 Organisation du génome du HCV et topologie membranaire des protéines de HCV clivées. 83
Figure 29 Interaction entre prédisposition génétique, facteurs environnementaux et occurrence du CHC 89
Figure 30 Caractéristiques des cellules cancéreuses. 91
Figure 31 Modèle histologique d'acquisition du phénotype cancéreux 93
Figure 32 Les facteurs de risques et mécanismes conduisant à l'hépatocarcinogénèse 95
Figure 33 Système de classification BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer) du carcinome hépatocellulaire et planification des traitements 99
Figure 34 Rôle de HBx dans la réplication de HBV et le développement du CHC 115
Figure 35 Etapes de l'ubiquitination d'une protéine via le complexe CUL4A/DDB1 143
Figure 36 Schématisation de la cascade de neddylation 145

Figure 37 L'association entre le complexe DDB1/E3 ubiquitine ligase et HBx est similaire de celle avec les protéines DCAFs 147
Figure 38 Défauts de ségrégations des chromosomes observés en l'absence des protéines SMC. 171
Figure 39 Les membres de la famille SMC 173
Figure 40 La cohésine participe à la régulation de la transcription 175
Figure 41 La condensine participe à l'inhibition de la transcription des gènes 175
Figure 42 Les 4 caractéristiques d'un facteur de restriction. 179
Figure 43 Résumé du mode d'action des facteurs de restriction de HIV 181
Figure 44 L'action antivirale de DDX3 sur l'infection par HBV 183
Figure 45 Modèle théorique pour expliquer le rôle de HBx et de SMC5/6 dans la régulation de la transcription de l'ADNccc. 187
Figure 46 Implication de SMC5/6 dans la réparation des lésions double brin. 189
Figure 47 Implication de SMC5/6 dans le maintein des fourches de réplication 191
Figure 48 Implication de SMC5/6 dans la réplication de l'ADN 193
Figure 49 Représentation des principales voies de réparation de l'ADN 199
Figure 50 Activité des principales voies de réparation des DSB en fonction du cycle cellulaire. 201
Figure 51 Représentation schématique de la voie de réponse aux dommages à l'ADN 201
Figure 52 PARP1 est impliquée dans la reconnaissance des lésions de l'ADN 205
Figure 53 Mécanismes de cytotoxicité induits par les inhibiteurs de PARP 207
Figure 54 Impact de l'expression de HBx sur la réparation des foyers de γH2AX après exposition aux radiations ionisantes. 209
Figure 55 Présence de la protéine SMC6 dans les lignées utilisées 211
Figure 56 Modulation des voies de réparation suite au stress réplicatif induit par l'hydroxyurée en présence de la protéine HBx 213
Figure 57 L'expression de HBx dans les cellules HepaRG est ralentie la croissance cellulaire 214
Figure 58 Le principe de la létalité synthétique adapté au traitement des cellules cancéreuses. 215
Figure 59 L'utilisation des inhibiteurs de PARP dans le cas de cellules mutées sur le gène BRCA 216
Figure 60 Les inhibiteurs de PARP sensibilisent les cellules aux rayons ionisants : un effet plus important lors de l'expression de HBx 217
Figure 61 Comparaison de l'efficacité de deux inhibiteurs de PARP, le Veliparib et le Talazoparib 219
Figure 62 PARP1 fait parti des 9 gènes les plus surexprimés dans les CHC toutes étiologies confondues 221
Figure 63 Niveau d'expression de PARP1, PARP2, PARP3 et PARG dans les CHC toutes étiologies confondues dans les tissus tumoraux et non-tumoraux. 222
Figure 64 Niveau d'expression de PARP1 dans les CHC d'étiologies différentes et corrélation de l'expression avec la survie des patients 223
Figure 65 Schématisation de la voie de signalisation d'ATR et RPA 225
Figure 66 Détournement des modifications post traductionnelles par les virus. 233

Liste des Tableaux

Tableau 1 **Interprétation des tests sérologiques pour l'infection par HBV** 25
Tableau 2 **Evolution de l'infection par HBV en fonction de l'âge au moment de l'infection** 28
Tableau 3 **Types, marques et fonctions des modifications de la chromatine** 49
Tableau 4 **Résumé des différents modèles animaux disponibles et leurs caractéristiques** 56
Tableau 5 **Facteurs favorisant le CHC chez les patients HBV** 107
Tableau 6 **Protéines virales interagissant avec le complexe CUL4-DDB1-E3 ubiquitine ligase** 145
Tableau 7 **Dommages sur l'ADN induits spontanément dans la cellules ou radio-induits** 202
Tableau 8 **Liste des différentes lignées cellulaires utilisées dans cette étude et leurs caractéristiques.** 211

Les études menées au cours de ces années de thèse et ayant permis la rédaction de ce manuscrit ont été réalisées par Laetitia GEROSSIER, au sein du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), INSERM U1052, UMR CNRS 5286, Centre Léon Bérard, dirigé par A. PUISIEUX. 141 Cours Albert Thomas, 69003, Lyon, France.
Cette thèse a été encadrée par : Dr. Olivier HANTZ et Dr. Isabelle CHEMIN

Liste des Abréviations

3D-CRT	Radiothérapie de conformation tridimensionnelle
aa	Acides aminés
AAV	Adénovirus
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNccc	ADN circulaire clos de façon covalente
ADNrc	ADN sous forme relâchée circulaire
AFB1	Aflatoxine B1
AFP	Alpha-foeto-protéine
ALAT	Alanine aminotransférases
ALT	Alternative Lengthening of Telomere
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messager
ARNpg	ARN pré-génomiqe
ASAT	aspartic acid aminotransferases
ATM	Ataxia telangiectasia mutated protein
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
BCLC	Barcelona Clinic Liver Cancer
BCP	Basal Core Promoteur
BER	Base excision repair - Réparation par excision de base
BHV-1	Bovine Herpes virus 1
BPV	Bovine Papilloma Virus
CCNE1	cycline 1
CHC	Carcinome Hépatocellulaire
ChIP	Chromatine ImmunoPrecipitation
CRE	Séquence CRE (CREB-binding site-like sequence)
CREB	C-AMP Response Element-binding protein
CRL	Cullin-RING-ligase
CSN	CSN5 subunit of the COP9 signalosome
DCAF	DDB1 Cullin Accesory Protein
DDB1	DNA Damage Binding Protein 1
DDR	DNA Damage Response - Réponse aux Dommages à l'ADN
dHepaRG	HepaRG différenciées
DMSO	DiMéthyl SylfOxide
DNAPK	DNA-activated protein kinase
dNTP	Deoxyribonucleotide tri-phosphate
DR	Direct Repeat
DSB	Double Strand Break – Cassures double brin
EBV	Epstein-Barr Virus
Enh	Enhancer
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FAK	Focal Adhesion Kinase
GGH	Ground Glass Hepatocytes - hépatocytes en verres dépolis
Gy	Le gray (symbole Gy) est l'unité dérivée de dose absorbée
HBc-Ag	Antigène HBc

HBe-Ag	Antigène HBe
HBs-Ag	Antigène HBs
HBV	Virus de l'Hépatite B
HBXIP	Hepatitis B virus X-interacting protein
HCV	Virus de l'Hépatite C
HDAC	Histone deacétylase
HDV	Virus de l'Hépatite Delta
HIV	Virus de Immunodéficience Humaine
HPIV2	Human ParaInfluenza virus 2
HPV	Human Papilloma Virus
HR	Homologous Recombinaison - Recombinaison Homologue
HSPG	Heparan Sulfate Proteoglycan
HSV1	Herpes Simplex Virus 1
HTLVA	Human T-lymphotropic virus
HU	Hydroxyurée
IgM	Immunoglobuline M
IMRT	radiotherpaie a modulation d'intensité
INFI	Interféron de type I
INFα	Interféron α
IRM	Imagerie à Résonnance Magnétique
kb	kilobase
kDa	Kilo Dalton
KSHV	Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus
lncRNA	Long non coding RNA
MAPK1	mitogen activated protein kinase 1
MHV 68	Murine Gammaherpesvirus
miRNA	micro ARN
miRNA	Micro ARN
MLL4	mixed-lineage leukaemia protein 4
MMR	Mismatch repair - Réparation des mésappariements
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NAD+	nicotinamide adénine dinucléotide
NAFL	Non Alcoolic Fatty Liver
NAFLD	Non Alcoolic fatty Liver Disease
NAs	Analogues de Nucléos(t)ides
NASH	Non Alcoolic Steastose Hepatic - Steatose hépatique non alcoolique NAFL Non Alcoolic Fatty Liver
NEDD8	neural precursor cell-expressent developmentally downregulated protein 8
NER	Nucleotide Excison Repair - Réparation par excision de nucléotide
NHEJ	Non Homologous End Joining - Jonctions d'extrémités non homologue
NLS	Nuclear Localisation Séquence
NSE	Non-SMC Element
NTCP	Na+ (sodium) tauchlorate co-transporting polypeptide
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORF	Open Reading Frame - Cadre ouvert de lecture

PAR	poly(ADP-riboses)
PARG	poly(ADP-ribose) glycohydrolase
PARP	poly(ADP-riboses) polymérase
PARPI	Inhibiteurs de PARP
pb	Paire de base
PCR	Polymerase Chain Reaction - Réaction de polymérase en chaîne
PDGFRβ	platelet-derived- growth-factor (receptor)-β
PDGFβ	platelet-derived- growth-factor -β
PEG	PolyEthylène Glycol
PEI	Percutaneous Ethanol Injection - Injection percutanée d'éthanol
PHH	Primary Human Hepatocytes
PMH	Primary Macaca Hepatocytes
Plk1	Polo-like kinase 1
PTM	Post Translational Modifications - Modifications post traductionnelles
Pyk2	proline-rich tyrosine kinase
qPCR	PCR quantitative
R96E	Mutation de l'Arginine 96 en Acide Glutamique
RFA	Radio Frequence Ablation - Ablation par Radio Fréquence
RI	Radiations Ionisantes
RING	Really Interesting New Gene
ROCK1	Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1
ROS	Reactive Oxygene Species - Espèces Réactives de l'Oxygène
RPA	*Replication protein A*
SD	Déviation standard ou écart type
SENP5	Sentrin-specific protease 5
shRNA	*Small hairpin RNA* – ARN en épingle à cheveux
siRNA	*Small interfering RNA* - Petit ARN interférent
SMC	Structural Maintenance of Chromosome
SSB	Single Strand Break – Cassures simple brin
STAT1-2	signal transducer and activator of transcription 1 ou 2
SV40	Virus Simien 40
TACE	Transarterial Chemoembolisation - Chimioembolisation Transartérielle
TBP	TATA box binding protein
TCGA	The Cancer Genoma Atlas
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TFIIB	Transcription Factor II B
TGFβ	Transforming growth factor beta
TNF α	Tumor necrosis factor alpha
Ub	Ubiquitine
UPS	Ubiquitine Protease System
UV	Rayons Ultra-Violet
UV-DDB	UV-Damaged DNA-Binding Protein
VDAC3	voltage-dependant anion-selective channel protein 3
VEGF	vascular endothelial growth factor
γH2AX	Histone H2AX phosphorylée

L'infection chronique par le virus de l'hépatite B (HBV) est l'une des causes majeures de cancer hépatocellulaire (CHC) dans le monde. Les mécanismes de régulation du virus et de l'oncogenèse viro-induite sont, malgré de nombreuses années d'études, encore mal connus aujourd'hui. Cette thèse a pour but d'explorer le rôle de la protéine régulatrice HBx aussi bien d'un point de vue virologique et de la réplication du virus, que dans ses aspects carcinogènes et de son éventuelle implication dans le métabolisme des CHC.

La partie bibliographique de ce manuscrit comporte deux grands axes :

- Nous aborderons dans un premier temps le virus de l'hépatite B. Avec tout d'abord une partie sur la pathologie de l'infection, les caractéristiques du virus et les différents modèles d'études, suivi d'une description détaillée de la protéine HBx qui est au cœur de mes travaux de thèse. La compréhension des différents modèles d'études permet de mieux appréhender la multitude de résultats publiés à propos de la protéine HBx.
- La seconde partie de ces données bibliographiques reposera sur le CHC avec dans un premier temps une description de la pathologie, des différentes étiologies à l'origine du CHC et les traitements actuels. La dernière partie de cette introduction fera le lien entre le CHC et le HBV afin de comprendre comment le virus, et notamment la protéine HBx, prédispose au cancer du foie.

Dans la partie suivante de ce manuscrit nous aborderons les travaux réalisés au cours de cette thèse. La protéine HBx est indispensable à la régulation épigénétique de l'ADN viral : l'étude 1 nous a permis de confirmer dans un modèle plus proche des conditions *in vivo*, le rôle de HBx dans les modifications épigénétique de l'ADNccc. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Dr C. Neuveut (Institut Pasteur - Paris). Dans un deuxième temps, l'étude 2 traitant de l'implication de HBx au sein d'un complexe E3 ubiquitine ligase, fait la lumière sur un nouveau facteur de restriction du virus HBV : le complexe SMC5/6, travail réalisé avec l'équipe du Pr M. Strubin (CMU - Genève – Suisse) et l'aide de S. Fletcher (Gilead – USA). Vous trouverez en introduction de ce projet, une petite synthèse des données connues sur ce complexe. Ces travaux ont introduit une nouvelle notion peu connue pour HBV : les facteurs de restriction, dont la définition sera discutée à la suite de ces travaux.

L'étude 3 présentée dans ce manuscrit décrit pour la première fois les conséquences de la dégradation de SMC5/6 dans une cellule infectée par HBV et son implication dans les mécanismes de réparation de l'ADN, travaux rejoignant ceux dirigés par J. Hall dans notre laboratoire. L'introduction de ce projet présentera les mécanismes de réparation de l'ADN et l'implication de SMC5/6 dans ces mécanismes ainsi que les inhibiteurs de voies de réparation, tels que les inhibiteurs de PARP (PARPi), molécules utilisées pour améliorer l'efficacité de la radiothérapie dans le traitement de nombreux cancers. Notre étude s'est orientée dans un but thérapeutique, à savoir, pourrait-on exploiter l'absence de SMC5/6 dans les cellules infectées pour les rendre plus sensibles à la radiothérapie associée à l'utilisation d'inhibiteurs de voies de réparation ?

Enfin la partie discussion nous permettra de mettre en valeur ces différents projets et de comprendre que la protéine HBx et la dégradation de SMC5/6 pourraient être le point central à la réplication du virus et que cette modification des voies de réparation de l'ADN pourrait être détournée à des fins thérapeutiques contre le carcinome hépatocellulaire.

Partie 1. Le virus HBV

Plan

I. Le virus de l'hépatite B 22
I.1. L'infection 22
I.1.1. Epidémiologie 22
I.1.2. Modes de transmission 24
I.1.3. Symptômes 24
I.1.4. Diagnostic 26
I.1.5. Evolution de l'infection par HBV 26
I.1.6. Traitements 30
I.1.7. Prévention 32
I.2. Les caractéristiques du virus HBV 32
I.2.1. La composition du virus 34
I.2.2. Cycle de réplication 42
I.3. Le minichromosome viral : l'ADNccc 46
I.3.1. La formation de l'ADNccc 46
I.3.2. La composition de l'ADNccc 48
I.3.3. La régulation de l'activité de l'ADNccc 50
I.4. Modèles d'étude pour HBV 54
I.4.1. Les modèles animaux 54
I.4.2. Production de particules virales 58
I.4.3. Modèles cellulaires 60

II. La protéine HBx 66
II.1. Structure 66
II.2. Nécessité de HBx pour la réplication 68
II.2.1. HBx permet la régulation de gènes indispensables à la réplication du virus 70
II.2.2. HBx régule l'ADNccc au niveau épigénétique 72
II.2.3. L'interaction avec DDB1 nécessaire à la réplication du virus 74
II.3. Implication de HBx dans l'oncogenèse 76

I. Le virus de l'hépatite B

L'hépatite B est une infection du foie causée par le virus de l'hépatite B (HBV). Il s'agit d'un véritable problème de santé publique puisque l'infection chronique engendrée par le virus peut conduire à la cirrhose et au carcinome hépatocellulaire (CHC).

I.1. L'infection

I.1.1. Epidémiologie

Dans le monde, on estime à 2,5 milliards le nombre de personnes infectées ou ayant été infectées par le virus de l'hépatite B (HBV), soit 1/3 de la population mondiale. Parmi eux, 350 à 400 millions de personnes souffrent d'une hépatite chronique.

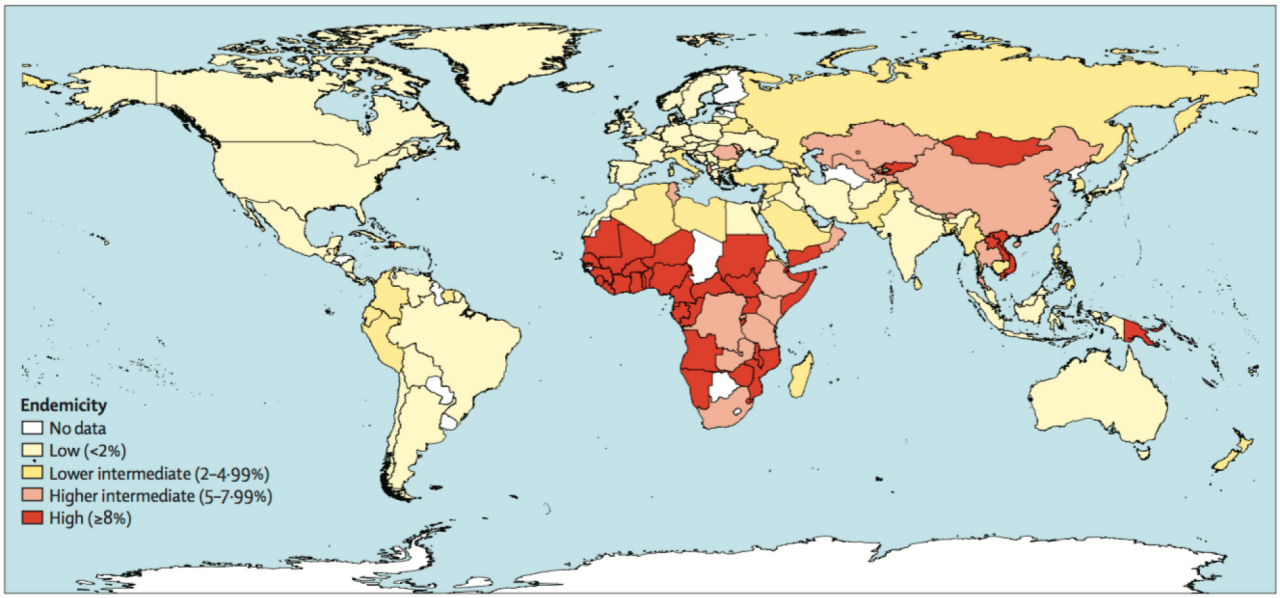


Figure 1 **Prévalence mondiale de l'infection par le virus de l'hépatite B de 1957 à 2013**

La prévalence est estimée par le marqueur HBsAg dans le sang. On retrouve trois types de régions principales : régions de forte endémicité en rouge, régions de moyenne endémicité en jaune foncé et régions à faible prévalence en jaune clair. Figure de *[1]*

Le pourcentage de personnes infectées varie selon la zone géographique. Les régions de forte endémicité sont l'Afrique Sub-Saharienne et l'Asie de l'Est (principalement la Chine) où près de 5 à 10% de la population adulte est infectée de façon chronique. Une forte prévalence est aussi rapportée en Amazonie et dans le sud de l'Europe centrale et de l'Europe de l'Est.
Les régions d'endémicité moyenne où 1 à 5% de la population est infectée correspondent au Moyen Orient et à l'Inde.
Enfin dans les régions de faible endémicité où moins de 1% de la population est infectée. Il s'agit essentiellement de l'Europe occidentale, de l'Amérique du Nord et du Japon. (FIGURE 1)

I.1.2. Modes de transmission

Le virus de l'hépatite B est transmis par contact avec le sang ou des fluides corporels contaminés tel que le sang ou le sperme. Les modes de transmissions classiques sont les suivants :
- relation sexuelle avec un partenaire infecté
- injection de drogues en partageant le même matériel (aiguilles, seringues…)
- transmission à l'enfant lors de l'accouchement d'une mère infectée et lors de l'allaitement
- contact avec le sang d'une personne infectée, par une plaie ou une exposition à du matériel contaminé (pour le personnel médical principalement).
- proximité familiale avec échange de rasoirs et brosses à dents avec une personne infectée
- transfusion sanguine : le dépistage systématique du virus lors des dons du sang a considérablement diminué le risque de transmission mais celui-ci reste présent (0,01%).

HBV est capable de survivre 7 jours en dehors d'un corps et reste infectieux. Le sang séché est donc une source possible de contamination.
Cependant HBV n'est pas transmis par la nourriture ou l'eau, les contacts avec les couverts, les baisers, les éternuements ou les mouchoirs sales ne sont pas sources de contamination pour HBV.
La période d'incubation du virus est en moyenne de 75 jours mais peut varier de 30 à 180 jours. Le virus peut être détecté dans les 30 à 60 jours après l'infection.

I.1.3. Symptômes

Les symptômes de l'infection par le virus de l'hépatite B varient en fonction de l'âge du patient. La plupart des enfants de moins de 5 ans et les adultes immunodéprimés sont asymptomatiques. En revanche 30 à 50% des patients de plus de 5 ans peuvent présenter des symptômes :
- Fièvre et fatigue
- Perte d'appétit, nausées et vomissements
- Douleurs abdominales
- Changement de couleur des selles et des urines
- Douleurs articulaires
- Jaunisse au niveau de la peau et des yeux.

Les porteurs d'une infection chronique sont le plus souvent asymptomatiques ou peuvent présenter des symptômes reflétant les différents stades de la pathologie (cirrhose ou CHC).

Tableau 1 ***Interprétation des tests sérologiques pour l'infection par HBV***

	Marqueurs sérologiques			
Interprétation/Phase de la pathologie	HBsAg	Anticorps totaux anti-HBcAg	IgM anti HBcAg	Anticorps anti HBsAg
Patient non vacciné, jamais infecté	-	-	-	-
Infection aigüe précoce ou patient après vaccination (21 jours)	+	-	-	-
Infection aigüe	+	+	+	-
Infection aigüe traitée par le patient	-	+	+	-
Infection passée et résolue, patient protégé	-	+	-	+
Infection chronique	+	+	-	-
Infection passée résolue ou Patient "faux positif"	-	+	-	-
Vaccination efficace, patient immunisé si le titre est >10mIU/ml	-	-	-	+

En fonction des résultats des tests sanguins et la présence ou l'absence des marqueurs sérologiques, il est possible de déterminer la phase de la pathologie. Un patient « faux positif » peut correspondre à différents cas : une infection passée ; une infection chronique avec peu de réplication du virus ; le transfert au nouveau-né d'une mère HBsAg positive. Tableau tiré de [2]

Une faible proportion des patients souffrant d'hépatite aiguë peut développer une hépatite fulminante à cause d'une décompensation du foie[1] très rapide conduisant au décès du patient.

I.1.4. Diagnostic

Il n'est pas possible en fonction des symptômes de distinguer une hépatite B d'une autre hépatite liée par exemple au virus de l'hépatite C (HCV). Mais une analyse sanguine permet de diagnostiquer une hépatite B. Cette analyse peut notamment être utilisée pour distinguer les hépatites aiguës de la forme chronique de la pathologie. Ces tests reposent sur la détection et la quantification des antigènes et anticorps spécifiques du virus de HBV: (**Tableau 1**)

- l'antigène de surface (HBsAg), signe d'un portage chronique ;
- l'anticorps anti-HBcAg (anti-HBc), signe d'une exposition au virus ;
- une sous-catégorie des anticorps anti-HBc, les immunoglobulines de classe M (IgM anti-HBc) signe d'une infection récente ou d'une réactivation virale.
- En cas de forte réplication de HBV, il est également possible de détecter les antigènes « e » (HBeAg), les anticorps anti-HBeAg (anti-HBe) et la quantité d'ADN viral. [3].
- Il est important de noter que la présence d'anticorps anti-HBs dans le sang est la preuve d'une réponse antivirale efficace et donc de la guérison ou de l'immunisation du patient en cas de vaccination.

HBsAg est le principal marqueur clinique d'une infection aiguë ou chronique par HBV et permet de définir la prévalence de la pathologie et l'endémicité de l'infection. [2]

Une infection aiguë est caractérisée par la présence de HBsAg et des anticorps anti-HBcAg. Pendant la phase initiale les patients sont également séropositifs pour l'HBeAg, marqueur d'une forte réplication virale. La présence d'HBeAg dans le sang indique des patients hautement contagieux. Il existe cependant des mutants du virus HBV, retrouvés principalement dans le bassin méditerranéen, dont les patients infectés présentent une réplication du virus mais n'expriment pas d'HBeAg.

L'infection chronique est définie par la persistance de l'antigène HBsAg au-delà de 6 mois (avec ou sans HBeAg). Il s'agit du principal marqueur de risque pour le développement d'une cirrhose ou d'un CHC dans les années à venir.

I.1.5. Evolution de l'infection par HBV

L'infection à l'âge adulte conduit dans 90% des cas à une guérison spontanée mais dans 10%, l'infection induit une hépatite chronique, premier pas vers le développement d'une cirrhose, terrain privilégié pour l'émergence d'un cancer hépatocellulaire.

Les enfants infectés à la naissance ou dans les premières années de leur vie, ayant un système immunitaire incomplet, ont 90% de risque de développer une chronicité s'ils sont en contact avec le virus du HBV [4]. Parmi les enfants avec une infection chronique, plus de 25% vont développer une cirrhose et/ou un CHC à la suite de cette infection. Les adultes quant à eux

[1] Dégradation, souvent brutale, des fonctions du foie jusqu'alors maintenue en équilibre par des mécanismes de compensation pour empêcher cette dégradation.

HBV : 350-400 millions de porteurs chroniques
HCV : 170-200 millions de porteurs chroniques

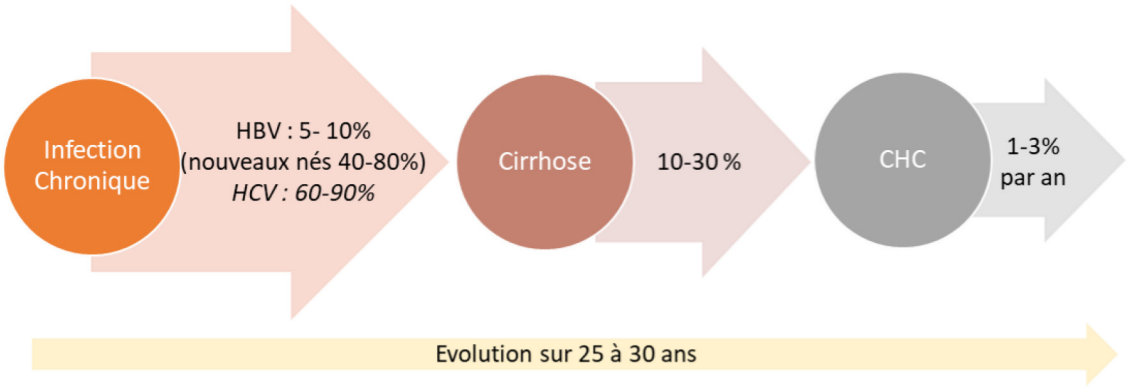


Figure 2 Evolution naturelle de l'infection chronique par le virus de l'hépatite B

Les chiffres pour HCV sont donnés à titre comparatif. Figure adaptée de [5]

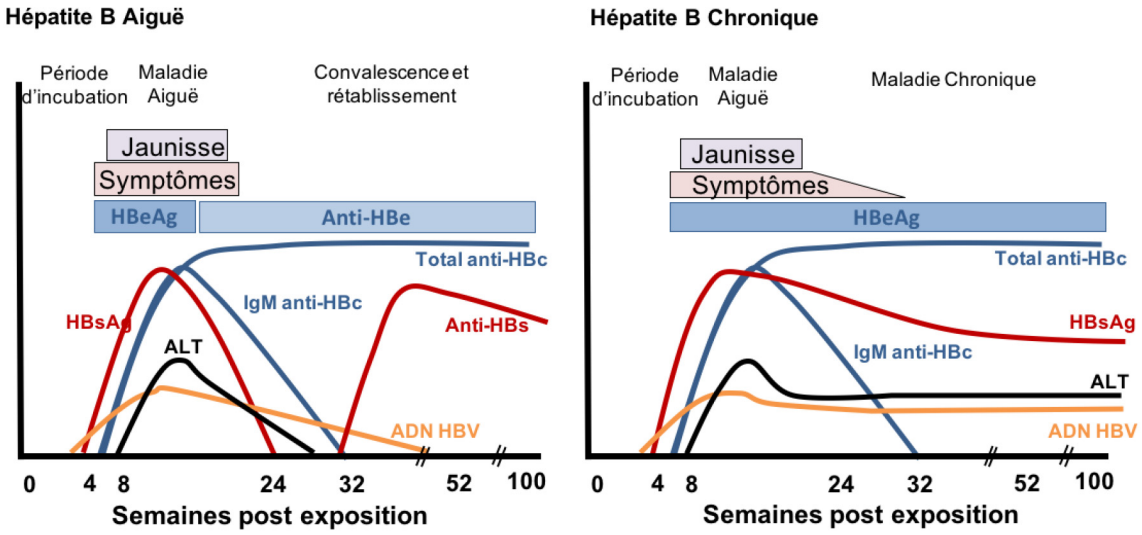


Figure 3 Comparaison des profils sérologiques des infections aiguës et chroniques

Figure adaptée de [7]

développent un CHC au taux de 5% par 10 ans, soit 100 à 300 fois plus que dans la population non infectée [6]. (TABLEAU 2 ET FIGURE 2)

Tableau 2 **Evolution de l'infection par HBV en fonction de l'âge au moment de l'infection**

Evolution	Age au moment de l'infection		
	Nouveau-nés	Enfants	Adultes
Infection chronique	90%	30%	1-5%
Guérison	10%	70%	95-99%

L'hépatite aigüe est dans 60 à 80% des cas asymptomatique, seuls quelques symptômes signes d'une lyse cellulaire au niveau du foie peuvent être observés à savoir une augmentation du taux d'ALAT (alanine aminotransferases) et ASAT (aspartic acid aminotransferases) dans le sérum, associée à un fort taux de HBsAg et d'ADN HBV. Dans de rares cas (1% seulement) les dégâts au niveau du foie sont trop importants et requièrent une transplantation hépatique dans de très courts délais. Après la phase aiguë, une fatigue peut persister pendant plusieurs mois jusqu'à la disparition de l'HBsAg dans le sang et l'absence de détection de l'ADN viral par PCR. (FIGURE 3)

L'infection chronique est définie par la persistance de l'HBsAg dans le sérum pendant plus de 6 mois. (FIGURE 3) L'infection chronique par HBV progresse de façon non linéaire et peut être divisée très schématiquement en 3 à 4 phases déterminées par des marqueurs sérologiques et histologiques :

i) Phase hautement réplicative, ou phase d'immunotolérance, caractérisée par de faibles marqueurs histocliniques (taux des aminotransférases normal) mais associées à un haut taux de HBeAg et d'ADN viral dans le sérum.
i) Phase de faible réplication, ou phase de clearance immunitaire, caractérisée par une phase d'hépatite aigue conduisant à une diminution de taux d'ADN et HBeAg dans le sérum.
ii) Phase non réplicative, caractérisée par une virémie visible uniquement par PCR, l'activité de l'hépatite est peu visible.
iii) Phase de réactivation, au cours du temps, en fonction d'éventuelles phases d'immunodépression (par exemple : chimiothérapies, prise de corticoïdes) la pathologie peut alors ré-émerger.

L'infection occulte par HBV est définie comme la persistance de l'ADN viral sous forme d'ADNccc ou intégré dans le foie des patients, en l'absence de marqueur viral dans le sang tel que l'antigène HBs [8].

Il est important de noter que le virus HBV est non cytopathique, les symptômes de la maladie hépatique observée sont essentiellement dûs à l'activité de la réponse immunitaire. Cependant il existe des exceptions : comme l'infection par certaines souches mutées de HBV ou les mutations dans le gène PréS2 qui peuvent conduire un stress oxydatif important.

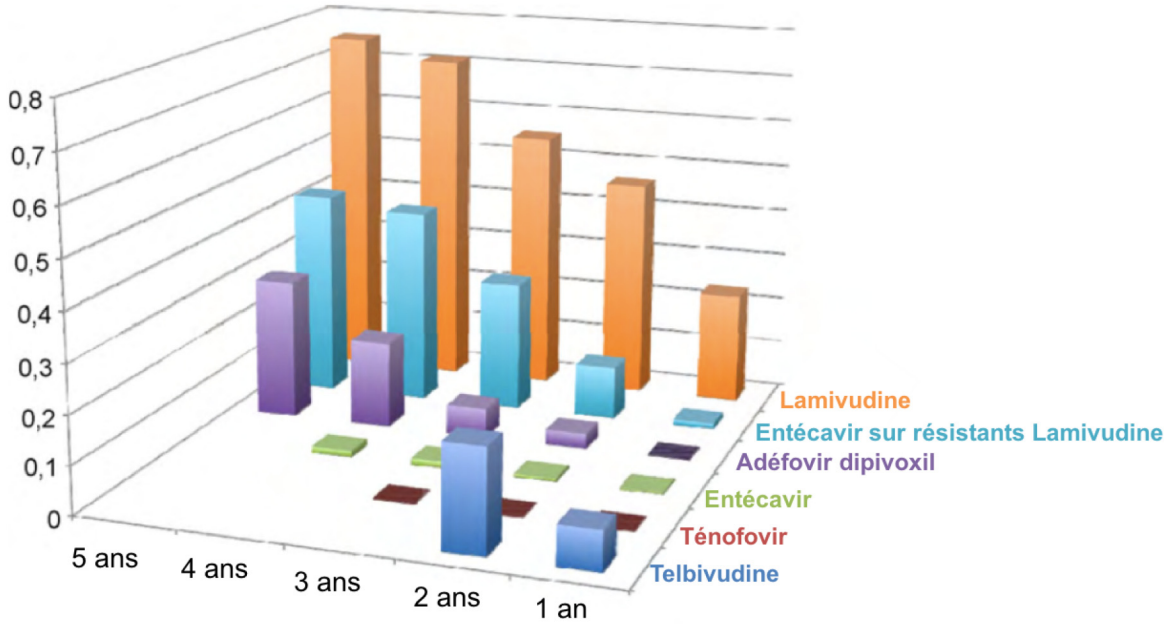


Figure 4 **Pourcentages de résistance observés en fonction des différents traitements**

Figure tirée de [9]

I.1.6. Traitements

Lors d'une infection aiguë, il n'existe pas de traitement curatif, mais seulement des traitements palliatifs pour aider à supporter l'infection.

Il existe plusieurs molécules pour traiter les patients atteints d'infection chronique notamment des antiviraux oraux. Ils inhibent la réplication virale et stoppent en grande partie la maladie hépatique. Ils permettent ainsi de ralentir la progression vers la cirrhose et le CHC et augmentent la survie à long terme. Il est nécessaire d'effectuer un suivi important chez ces patients. Actuellement les traitements utilisés sont divisés en 2 groupes principaux : les immuno-modulateurs dont l'interféron-α (INFα), et le PEG-IFN, et les analogues de de nucléos(t)ides (NAs) dont la Lamivudine, Adéfovir dipivoxil, Entécavir, Ténofovir, et le Telbivudine. [9]

Ces thérapies antivirales avec des analogues de nucléos(t)ides (NAs) permettent de bloquer la synthèse de l'ADN viral en supprimant la transcription inverse de la polymérase virale mais ne permettent pas d'éliminer l'ADNccc qui reste sous forme épisomale dans les cellules. L'inhibition de l'activité polymérase conduit à une diminution de la production de virions, du recyclage des nucléocapsides. Les NAs n'inhibent pas la formation de nouvelles molécules d'ADNccc ce qui implique que la faible virémie restante peut réinfecter de nouveaux hépatocytes et ainsi rétablir une infection. Une diminution du taux global d'ADNccc intrahépatique peut théoriquement être observée après de nombreuses années de traitement dû à : (1) une inhibition du recyclage intracellulaire, (2) une dilution de l'ADNccc lors du turnover des hépatocytes, l'ADN viral peut être perdu au cours des divisions cellulaires et (3) une diminution du nombre de nouvelles cellules infectées [10, 11].
Il existe trois générations de NAs parmi lesquelles les molécules les plus connues sont : la Lamivudine (analogue de pyrimidines), l'Entecavir et le Ténofovir (analogues de purines). L'utilisation à long terme de ces thérapies permet de réduire le risque de CHC en prévenant l'apparition de la cirrhose. Cependant, il ne s'agit pas d'un traitement curatif puisque l'arrêt du traitement conduit à un rebond de la pathologie. Actuellement, les NAs les plus conseillés dans le traitement de l'infection chronique sont le Ténofovir et l'Entécavir, dont une monothérapie de plus de 5 ans permet de maintenir une rémission du virus dans la majorité des patients [10].

Une autre approche thérapeutique est basée sur l'utilisation de l'interféron-α (INFα), qui induit de façon non spécifique l'expression des gènes stimulés par l'interféron et permet la production de protéines aux propriétés antivirales et l'activation des cellules immunitaires.
Utilisée dans le cas de patients HBV, l'activité antivirale de l'INFα repose sur l'activation des cellules NK (Natural Killer), une diminution de la transcription de l'ADNccc et pourrait déstabiliser l'ADNccc viral via l'activation d'APOBEC3A [12]. Cependant cette option thérapeutique est beaucoup moins utilisée du fait des effets secondaires de l'INFα sur le système immunitaire.

Les effets incomplets de ces thérapies ainsi que l'émergence de résistance conduisent aujourd'hui les recherches vers d'autres molécules thérapeutiques et/ou des combinaisons des traitements existants. En effet les premières générations de NAs, notamment la Lamivudine, ont conduit à l'émergence de souches de HBV résistantes aux traitements à cause de mutations dans le gène de la polymérase virale pour échapper au traitement. Les nouvelles molécules permettent aujourd'hui une meilleure efficacité et ont grandement diminué le nombre de résistances observées [9]. (FIGURE 4)

I.1.7. Prévention

La meilleure prévention contre le virus de l'hépatite B est la vaccination. L'OMS recommande la vaccination des enfants dès la naissance et le suivi d'un protocole important pour maximiser les effets de la vaccination. Le vaccin est efficace à 95% et permet de prévenir l'infection et ainsi la cirrhose et le CHC.

Le vaccin affiche des records de sécurité et d'efficacité. Depuis 1982, plus d'un milliard de doses ont été utilisées. Dans les pays endémiques avec 8 à 15% d'enfants qui développant une hépatite chronique, les campagnes de vaccination ont permis de réduire ce taux à 1% seulement.

Le vaccin contre l'hépatite B repose sur l'utilisation de l'antigène de surface HBsAg qui permet la synthèse d'anticorps anti-HBs. Lors de l'élaboration des premiers vaccins, des particules vides non infectieuses étaient purifiées du plasma de porteurs chroniques. Aujourd'hui les techniques de séquençage et de clonage permettent de produire les protéines d'enveloppe *in vitro*. Pour améliorer l'efficacité des vaccins, des molécules de 3ème génération ont été développées et contiennent les trois formes de la protéines HBs. [13]
Cependant, malgré les grands succès de la vaccination, des questions restent à résoudre comme le problème des individus non répondeurs ou mauvais répondeurs, la nécessité ou non d'un rappel de vaccination à l'âge adulte et l'émergence de virus mutants. [13]

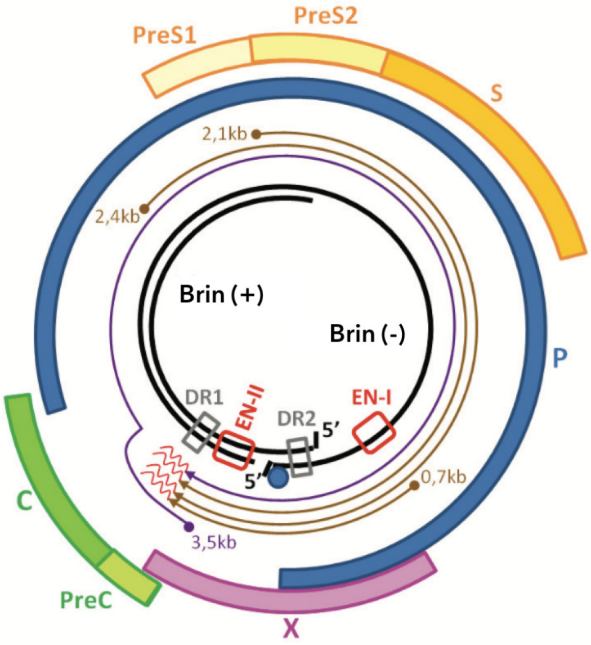
La prévention passe aussi par une meilleure éducation des populations avec une utilisation plus systématique des préservatifs, des conditions d'injection plus sûres et un screening obligatoire du sang prélevé sur les donneurs pour éviter les contaminations de transfusion.

I.2. Les caractéristiques du virus HBV

Le virus de l'hépatite B (HBV) est un membre de la famille des *Hepadnavirus*, essentiellement hépatotrope. Bien que virus à ADN, HBV est un pararétrovirus, proche des rétrovirus sur le plan de sa réplication (transcription inverse) et de son organisation génomique.

La famille des *Hepadnavirus* regroupe 2 genres : les *orthohepadnavirus* qui infectent les mammifères et dont HBV est le prototype et les *avihepadnavirus* qui infectent les oiseaux et dont le DHBV (Duck Hepatitis B virus) est le prototype.

Parmi les *orthohepadnavirus*, on retrouve, outre le virus humain et le virus des primates, le virus de la marmotte WHV (Woodchucks hepatitis virus), celui de l'écureuil GSHV (Ground squirrel hepatitis virus) et, récemment découvertes, différentes souches de virus de chauves-souris [14]. Certains passages inter-espèces entre mammifères ont été rapportés [14]. Il est intéressant de noter que seuls les virus de la marmotte et de l'écureuil peuvent engendrer un CHC comme le HBV au contraire du DHBV [15].
Un grand nombre d'études ont été effectuées sur le modèle du DHBV mais il existe des différences importantes entre cet *avihepadnavirus* et le virus humain. Par exemple, il a été rapporté que le DHBV est capable d'infecter d'autres types cellulaires en dehors des hépatocytes tels que, par exemple, l'épithélium des conduits biliaires, certaines cellules du pancréas ou du rein. Cependant cette observation n'a pas été confirmée pour le virus du HBV



PréS1/PréS2/S : ORF des 3 protéines d'enveloppes HBs
P: ORF de la polymérase virale
PréC/C: ORF de la protéine de capside HBc et de l'antigène HBeAg
X: ORF de la protéine HBx

Les flèches indiquent les différents transcrits de HBV, en marron des ARNm et en violet l'ARNpg

Brin (-) : brin d'ADN à polarité négative
Brin (+): brin d'ADN à polarité positive

DR : séquences répétées de 11 nucleotides

EN : régions enhancer

polyA
Polymérase virale

Figure 5 **Représentation du génome de HBV**

uniquement hépatotrope. Par convention, on considère qu'une cellule infectée est définie par la présence d'ADNccc, la matrice de la transcription du virus [15].

Le virus de l'hépatite B est l'un des plus petits virus enveloppés du monde animal avec un diamètre de 42nm.
Il existe 8 génotypes d'HBV (A à H) définis sur la base de variation dans la séquence nucléotidique engendrant une variabilité dans les épitopes de l'antigène HBs. Il existe une répartition géographique prédominante pour certaines souches, par exemple en Europe on retrouve principalement les souches A et D, la souche E est majoritaire en Afrique et la souche I en Asie [16].

I.2.1. La composition du virus

I.2.1.a. Le génome de HBV

Le génome de HBV est une molécule d'ADN de 3,2 kb de long, il est caractérisé par :

1/ une forme circulaire, partiellement double brin sur 50 à 80% de sa longueur. Il s'agit de la conformation présente dans les virions, l'ADNrc (ADN relâché circulaire).

2/ un cycle de réplication qui nécessite une étape de transcription inverse (voir paragraphe spécifique)

3/ une capacité à s'intégrer dans le génome cellulaire

4/ une forme épisomale appelée ADNccc pour ADN circulaire clos de façon covalente, dans les cellules infectées.

Le génome viral inclus dans le virion, l'ADNrc, est constitué d'un brin de polarité négative complet (polarité opposée à celle des ARNm), et d'autre part d'un brin de polarité positive incomplet, laissant ainsi un « trou » (« gap ») simple brin dans l'ADN [17]. (FIGURE 5)
La conformation relâchée circulaire est rendue possible par la présence au niveau du « trou » d'un petit chevauchement cohésif de 200 nucléotides entre les extrémités 5' des deux brins d'ADN. Cette région contient également deux séquences répétées DR1 et DR2 de 11 nucléotides, essentielles à la réplication virale. Le brin négatif complet est le brin qui sera transcrit ; il est associé à la polymérase virale de façon covalente, par l'intermédiaire d'une liaison phosphodiester en 5', dans la particule virale. De plus, une amorce ARN de 18 nucléotides est présente à l'extrémité 5' du brin positif incomplet, pour permettre l'initiation de la synthèse d'ADN afin de compléter ce brin. Toutes ces spécificités de l'ADNrc devront être supprimées pour permettre la complémentation de l'ADN et ainsi former l'ADNccc au cours du cycle viral [18].

Le génome est composé de 4 cadres de lecture chevauchant qui conduisent à la production de 4 types d'ARN messagers (3,5kb, 2,4 kb, 2,1 kb et 0,7kb). L'expression de ces transcrits est régulée par 4 promoteurs (Cp (Core promoteur, PS1p (PréS1 promoteur, Sp (S promoteur) et Xp (HBx promoteur)) et par 2 enhancers (Enh I et Enh II).

Les différents ARNm seront traduits en 7 protéines virales :

- Le gène PréC/C code pour la protéine de capside core ou HBc et les antigènes HBeAg, PréCore et HBcAg

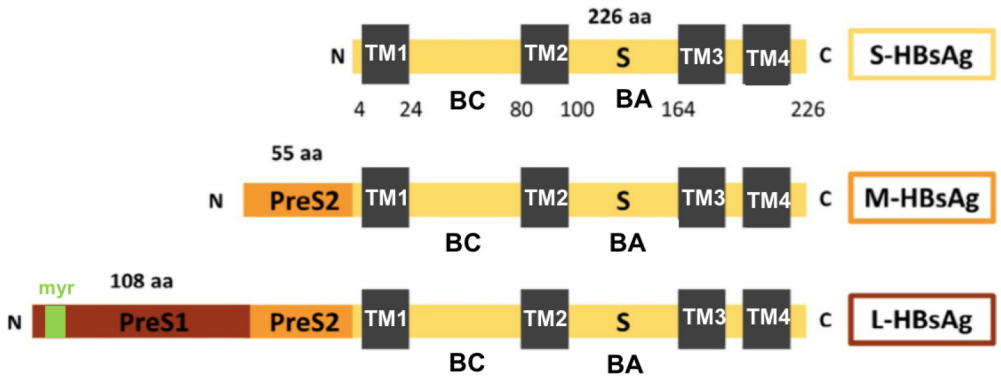


Figure 6 Les protéines d'enveloppe de HBV

Les 3 formes des protéines HBs partagent la même région C terminale (S) qui contient 4 domaines transmembranaires (TM), une boucle cytosolique (BC) et une boucle antigénique (BA). Différents codons d'initiation permettent la transcription des autres formes : M-HBsAg contient le domaine PréS2, et la forme L-HBsAg est constituée en plus du domaine PréS1. Le domaine PréS1 contient un site de fixation de l'acide myristique (myr, vert). Figure adaptée de [19]

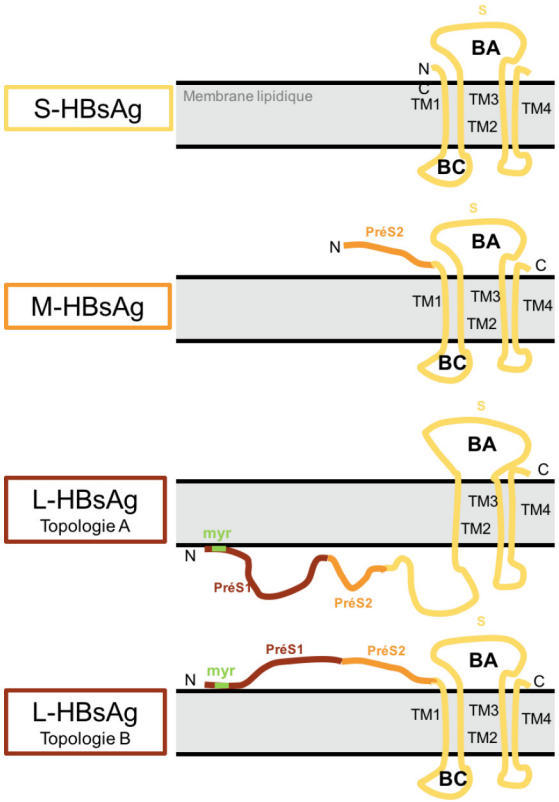


Figure 7 Topologie membranaire des protéines HBs

Ancrage dans la membrane lipidique des trois formes de protéines HBs, avec leurs domaines transmembranaires (TM), leurs boucles antigéniques (BA) et cytosoliques (BC). La double topologie de la protéine L-HBsAg est représentée. La topologie A permet l'enveloppement de la nucléocapside, la topologie B permet l'externalisation de l'acide myristique et favorise ainsi la reconnaissance des hépatocytes via la récepteur NTCP. Figure adaptée de [24]

- Le gène PréS1/PréS2/S code pour les 3 protéines de surface : S-HBsAg, M-HBsAg et L-HBsAg
- Le gène P code pour la polymérase virale à activité de transcriptase inverse
- Le gène X code pour la protéine HBx, une protéine régulatrice participant entre autres à la régulation de la transcription du virus [15]. (Voir le chapitre spécifique)

L'intégration dans le génome de la cellule et l'existence de l'ADNccc sont les mécanismes qui participent à la persistance du virus lors d'une infection chronique.

I.2.1.b. Les protéines virales

HBs

Les protéines HBs sont les glycoprotéines d'enveloppe du virus. Il existe 3 formes de protéines HBs codées par le même ORF PréS1/PréS2/S contenant 3 codons d'initiation en phase. Ces différents transcrits conduisent à la production des 3 protéines HBs : la grande glycoprotéine L (pour « Large »), la moyenne M (pour « Middle ») et la petite S (pour « Small »). Ces trois protéines peuvent être de taille variable en fonction de la présence de glycosylations. La partie commune de ces 3 protéines d'enveloppe, **la protéine S**, est très hydrophobe et possède 4 domaines transmembranaires, elle permet donc l'ancrage dans la membrane et joue des rôles importants dans l'assemblage du virion et potentiellement dans la fusion membranaire. (FIGURE 6) La protéine S peut être glycosylée ce qui participe à son antigénicité mais aussi à l'entrée du virus dans la cellule hôte.

Les protéines M et L résultent des extensions de S en position N-terminale, domaines PréS2 et PréS1. Les glycosylations de la protéine M sembleraient impliquées dans l'assemblage des particules, mais le rôle exact de la protéine M (absente chez les *avihepadnavirus*) est encore mal déterminé [20]. **La protéine L** possède la région PréS1 qui a la particularité de posséder un site de fixation pour un acide myristique [21], acide gras permettant l'ancrage de la protéine dans la membrane. La myristilation de la protéine L est indispensable à l'entrée du virus [22]. C'est d'ailleurs l'utilisation d'un peptide dérivé du PréS1 myristilé qui a permis l'identification du récepteur NCTP, récepteur d'entrée du virus HBV [23]. La protéine PréS1 est capable d'adopter une double topologie. Initialement, les domaines PréS1, PréS2 et TM1 de L-HBsAg sont exposés du côté cytosolique afin de participer à l'enveloppement de la nucléocapside. Au cours du transport du virion à la surface de la cellule, une partie des protéines L change de conformation, le domaine TM1 acquiert sa fonction transmembranaire ce qui expose les domaines PréS1 et PréS2. Cette topologie est nécessaire car l'extrémité N-terminale de PréS1 contient l'acide myristique déterminant dans la reconnaissance des hépatocytes par les virions [24]. (FIGURE 7)

L'enveloppe HBs de HBV est détournée par un virus satellite de HBV, le virus de l'Hépatite Delta[2] (HDV). Celui-ci co-infecte avec HBV les hépatocytes humains et utilise les protéines d'enveloppe de HBV pour se répliquer. Le mécanisme d'entrée de HDV est le même que pour HBV, notamment l'utilisation du récepteur NTCP.

[2] HDV : le virus de l'Hépatite D est un petit virus à ARN, considéré comme un virus satellite de HBV, il ne peut pas se répliquer en l'absence des protéines HBs de HBV

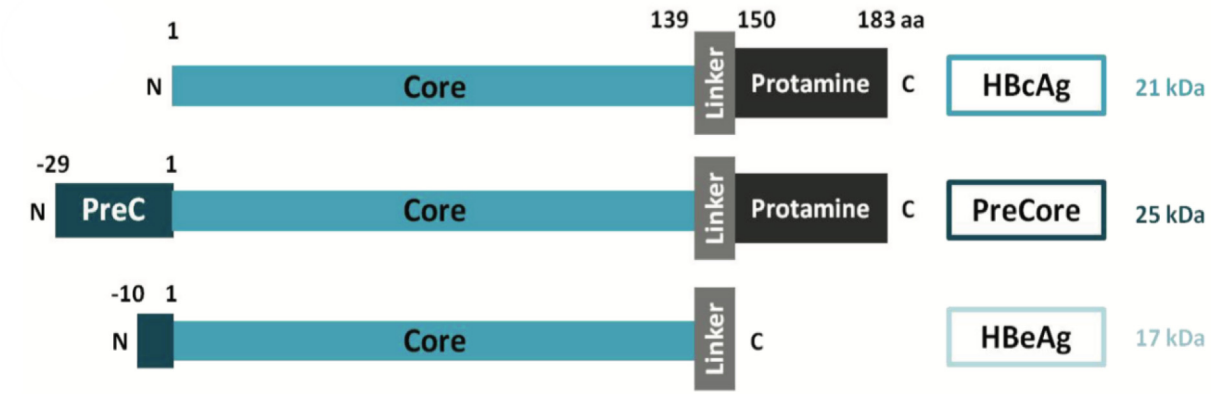


Figure 8 **Représentation schématique des séquences des protéines HBc/PréC/HBe**

Représentation des différents domaines protéiques et leur position dans la chaîne d'acides aminés des protéines HBcAg, PréCore et de HBeAg. Figure inspirée de [27] et [7]

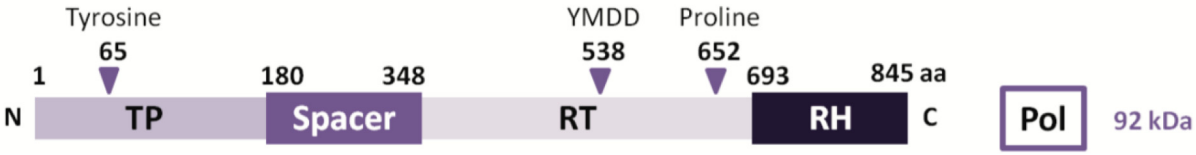


Figure 9 **Représentation de la séquence de la polymérase de HBV**

La protéine est composée de 4 domaines majeurs, TP pour « Terminal Protein », la région charnière « spacer », RT pour le domaine avec l'activité rétro-transcriptase, RH pour l'activité RNAse H. Les triangles violets précisent l'emplacement de sites importants souvent impliqués dans les mutations de résistance aux traitements antiviraux. Figure inspirée de [30] et [7]

HBc, PréCore et HBe

La capside virale, d'un diamètre de 34nm, est constituée de 120 dimères de protéines Core ou **HBc**.
La protéine HBc de 21kDa possède 183 aa. Elle est composée de plusieurs domaines impliqués dans différentes étapes de cycle viral. Le domaine majeur ou « cœur » est impliqué dans la réplication du génome et l'assemblage avec les protéines d'enveloppe. Le domaine C-terminal serait nécessaire à la fixation à l'ARN viral prégénomique, la rétrotranscription et l'encapsidation [18], ainsi qu'à l'adressage des capsides au noyau grâce à la présence d'une séquence signal de localisation nucléaire [25]. (FIGURE 8)

La protéine **PréCore** est une protéine non structurale de 25kDa ; c'est un précurseur de l'antigène **HBe** (HBeAg).
HBe est une protéine soluble et sécrétée de 17kDa, elle est produite par le clivage enzymatique de la protéine PréCore. Elle contient un peptide signal de sécrétion et est incapable de former des capsides [26]. La présence d'HBeAg dans un sérum de patients infectés par HBV marque une réplication active du virus. Le rôle de HBeAg est incertain mais pourrait intervenir dans l'inhibition ou le ralentissement de la réponse immunitaire [15].

La polymérase virale

Le gène P recouvre prêt de 80 % du génome et code pour la polymérase virale. Il s'agit de la plus grosse protéine du virus HBV avec 92 kDa et environ 845 aa.
Elle comprend 4 domaines importants et responsables de fonctions différentes :

1/ En N-terminal le domaine TP ou « Terminal Protein » contient notamment une tyrosine en position 65 nécessaire à la liaison covalente, par une liaison phosphodiester, au niveau du signal de packaging ε de l'ARN prégénomique. Cette liaison permet l'amorçage de la rétrotranscription [28]. D'autres acides aminés ont également été mis en évidence pour jouer un rôle dans l'encapsidation de l'ARN viral et la synthèse de l'ADN viral [29].

2/ Un domaine charnière ou « spacer » permettant la connexion des différents domaines.

3/ Un domaine ADN polymérase à activité de rétrotranscription (domaine RT). En effet le virus de HBV possède sa propre activité enzymatique de transcriptase inverse, similaire à celle des rétrovirus [30].

4/ Un domaine RNAse H (RH), indispensable à la réplication virale, il est responsable de la dégradation de l'ARN prégénomique ainsi que de la production de la petite amorce d'ARN nécessaire à l'initiation de la rétrotranscription en ADN [31]. (FIGURE 9)

La polymérase virale est la cible de nombreux traitements antiviraux. L'utilisation de ces traitements à long terme conduit à l'apparition de virus mutants résistants aux traitements. Un grand nombre de ces mutations est retrouvé au sein du gène de la polymérase et affectent sa séquence protéique [32].

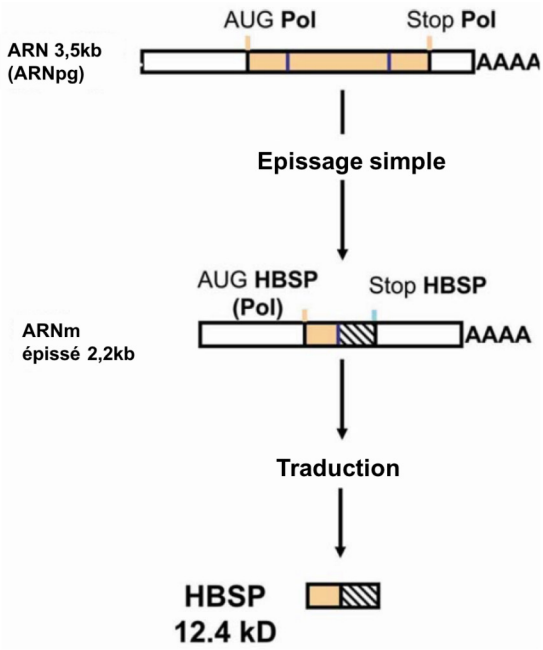


Figure 10 **Représentation schématique de la production de HBSP suite à l'épissage de l'ARNpg**

L'épissage de l'ARNpg conduit à un ARNm de 2,2kb, la traduction initiée au niveau du codon start (AUG) de la polymérase produit la protéine HBSP en raison du changement de cadre de lecture. Figure de [36]

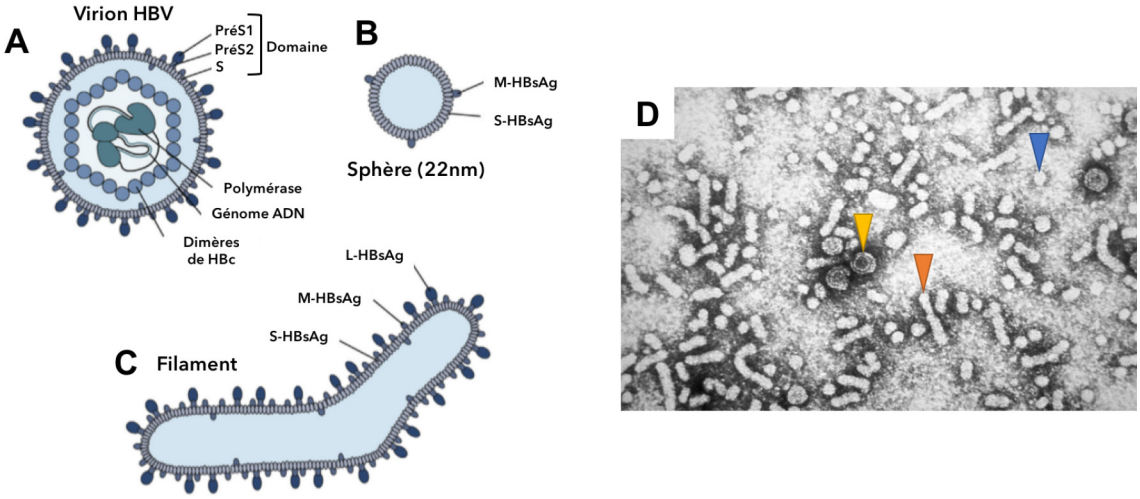


Figure 11 **Les différentes particules virales et subvirales**

A- La particule de Dane, une nucléocapside enfermant l'ADN viral et la polymérase, enveloppés par des protéines HBs (S, M et L) composées par les différents domaines PréS1/PréS2/S.
B- Particule subvirale sphérique de 22 nm, composée principalement par des protéines S-HBsAg et quelques M-HBsAg
C- Particule subvirale en forme de filaments ou de bâtonnets de longueur variable, composée par les trois types de protéines HBs
D- Image de microscopie électronique représentant les différentes particules virales (en jaune, les particules de Dane, en bleu les sphères, en orange les filaments).
Figure adaptée de [40] et du CDC (Center for Disease Control and Prevention)

HBx

HBx est la plus petite protéine d'HBV, c'est une protéine non structurale de 17kD et 154 aa ; c'est sans doute la protéine du virus qui a fait l'objet du plus grand nombre de publications mais dont les multiples fonctions décrites ne sont pas toutes validées.
HBx est impliquée à la fois dans la réplication du virus d'HBV mais aussi dans la transactivation de gènes cellulaires et viraux ; ainsi elle affecterait les processus d'apoptose, le cycle cellulaire et participerait à l'oncogenèse du virus HBV.
Ces diverses fonctions seront abordées dans le chapitre spécifique à la protéine HBx.

HBSP

La protéine HBSP pour « Hepatitis B Spliced Protein » a été mise en évidence plus récemment à partir de biopsies de foies de patients infectés par HBV. Il s'agit d'une protéine issue d'un épissage de l'ARN prégénomique d'HBV. Cet épissage est à l'origine d'un ARN de 2,2kb appelé SP1, qui peut être traduit en une protéine d'environ 12kDa et 93aa [33]. La traduction de cette protéine commence au codon start de la polymérase et inclus les 46 aa de la polymérase, puis les 47 aa suivant correspondent à une nouvelle séquence d'acides aminés générée par le nouveau cadre de lecture (FIGURE 10). La présence de cette protéine n'est détectée que pour HBV mais pas pour les virus DHBV ou WHV.
Les fonctions biologiques de cette protéine ne sont pas vraiment définies. Néanmoins HBSP semble jouer un rôle dans l'infection par HBV de par son implication dans la pathogénicité et/ou la persistance de l'infection [34]. Pour cela HBSP interagit avec les mécanismes de l'immunité et contribuerait à limiter l'inflammation hépatique au cours d'une affection chronique de façon à favoriser la persistance de HBV en échappant au système immunitaire [35].

I.2.1.c. Les particules virales

Il existe trois types de particules virales circulantes que l'on peut retrouver dans le sang des patients infectés. (FIGURE 11)

- Les virions ou les particules de Dane, du nom du premier auteur les ayant décrites [37], sont formés d'une enveloppe lipidique constituée par les protéines HBs S, M et L qui renferment une nucléocapside icosaédrique de protéines core ou HBc. On retrouve à l'intérieur de cette nucléocapside le génome viral sous sa forme d'ADNrc ainsi que la polymérase virale. Ce sont les seules particules infectieuses.

- Les particules subvirales sont divisées en différents types :
    - **Les particules sphériques**, de symétrie octaédrique et de 22nm de diamètre sont les plus abondantes dans le sang des patients infectés par HBV (jusqu'à 10^{12} particules /ml)

    - **Les particules en forme de bâtonnets** ont une structure désordonnée (sans symétrie remarquable), font 20-22 nm de largeur et sont de longueur variable.

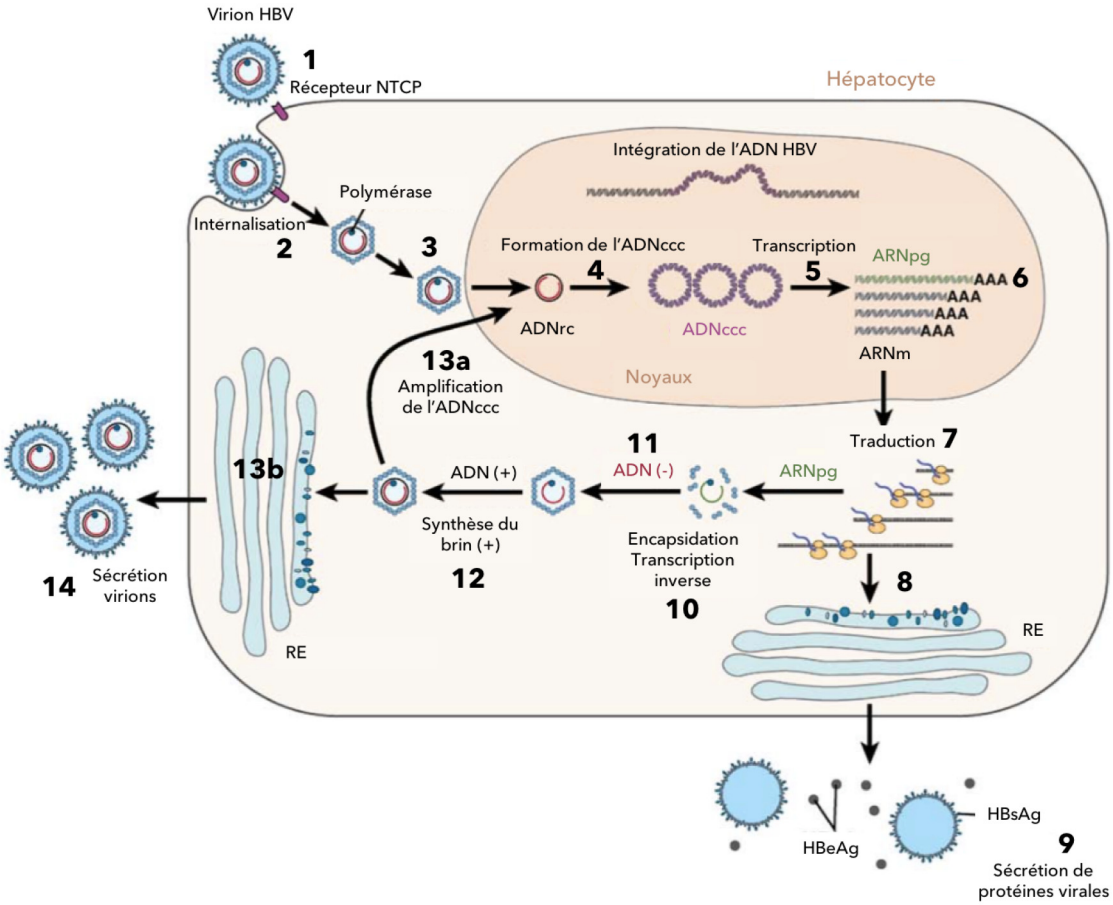


Figure 12 **Cycle de réplication du virus HBV**

Les différentes étapes clés de la réplication du virus sont indiquées par les chiffres noirs et correspondent aux paragraphes du texte. RE= Réticulum endoplasmique
Figure adaptée de [41]

- Ces particules subvirales ne contiennent pas de capside et sont constituées uniquement de lipides et de protéines HBs, mais leur composition en protéines HBs varie par rapport aux particules de Dane. Elles disposent de très peu de protéines L-HBsAg dans la topologie permettant l'externalisation de l'acide myristique (FIGURE 7). Ainsi il n'existe pas de compétition entre les particules vides et les particules infectieuses au niveau des récepteurs NTCP [24]. Elles sont produites en excès durant la réplication du virus et sont présentes à des titres bien supérieurs aux particules de Dane dans le sang.

- Plus récemment, de nouvelles classes de virions ont été mises en évidence, **des virions vides**, sans génome, constitués uniquement d'une capside enveloppée et retrouvés à des taux 100 fois supérieur que les particules de Dane dans le sang des patients infectés. De plus, des études suggèrent la présence de particules contenant uniquement de l'ARN viral à un taux bien inférieur aux autres particules (100 à 1000 fois moins que les virions complets) [38, 39].

I.2.2. Cycle de réplication

Le cycle de réplication du virus est divisé en plusieurs étapes clés : (FIGURE 12)

1/ Le virion reconnaît et s'attache à l'hépatocyte en 2 étapes ; tout d'abord l'attachement initial implique la reconnaissance entre la boucle antigénique de la protéine d'enveloppe S du virus et les chaînes carbohydrates des sulfates d'héparine de protéoglycanes, ou HSPG (pour « Heparan Sulfate Proteoglycan ») associées aux hépatocytes [42] [43]. Ensuite le virion peut être internalisé par le biais de l'association entre le récepteur NTCP [44] et le domaine PréS1 de la protéine d'enveloppe L-HBs (plus précisément la région N-terminale myristoylée). La découverte du récepteur NTCP est récente, il s'agit d'un transporteur d'acides biliaires, appelé sodium (Na+) - tauchlorate co-transporting polypeptide, ou NTCP, exprimé sur la membrane baso-latérale des hépatocytes.

2/ L'internalisation du virion se fait par endocytose dans la cellule hôte. Les mécanismes mis en jeu ne sont pas encore déterminés. La fusion entre l'enveloppe du virus et la vésicule d'endocytose permet de libérer les capsides dans le cytoplasme.

3/ Les particules intra-cytoplasmiques migrent dans le noyau par l'intermédiaire des microtubules et par la présence de séquence NLS sur la capside par les protéines HBc, puis pénétration de l'ADN du HBV dans le noyau [25].

4/ Par un mécanisme encore mal connu, l'ADNrc du virion est réparé et converti en ADN double brin circulaire fermé de façon covalente dans le noyau. On parle alors d'ADNccc (Covalently Closed Circular DNA). L'ADNccc s'associe à des histones cellulaires pour former un « mini chromosome », sous une forme super enroulée [45]. Malgré une absence de connaissance concernant les mécanismes mis en jeu on sait que cette conversion passe par une étape de dissociation de la polymérase virale et de l'amorce ARN. Cela donne lieu à la formation d'un intermédiaire de réplication appelé ADNrc déprotéinisé, une endonucléase pourrait être impliquée dans ce phénomène. Selon de nombreuses études contradictoires, l'élongation du brin incomplet s'initierait à l'extrémité 3' grâce à la polymérase virale P, ou à une polymérase cellulaire. Ensuite, la réparation de l'ADNrc déprotéinisé, c'est-à-dire la liaison

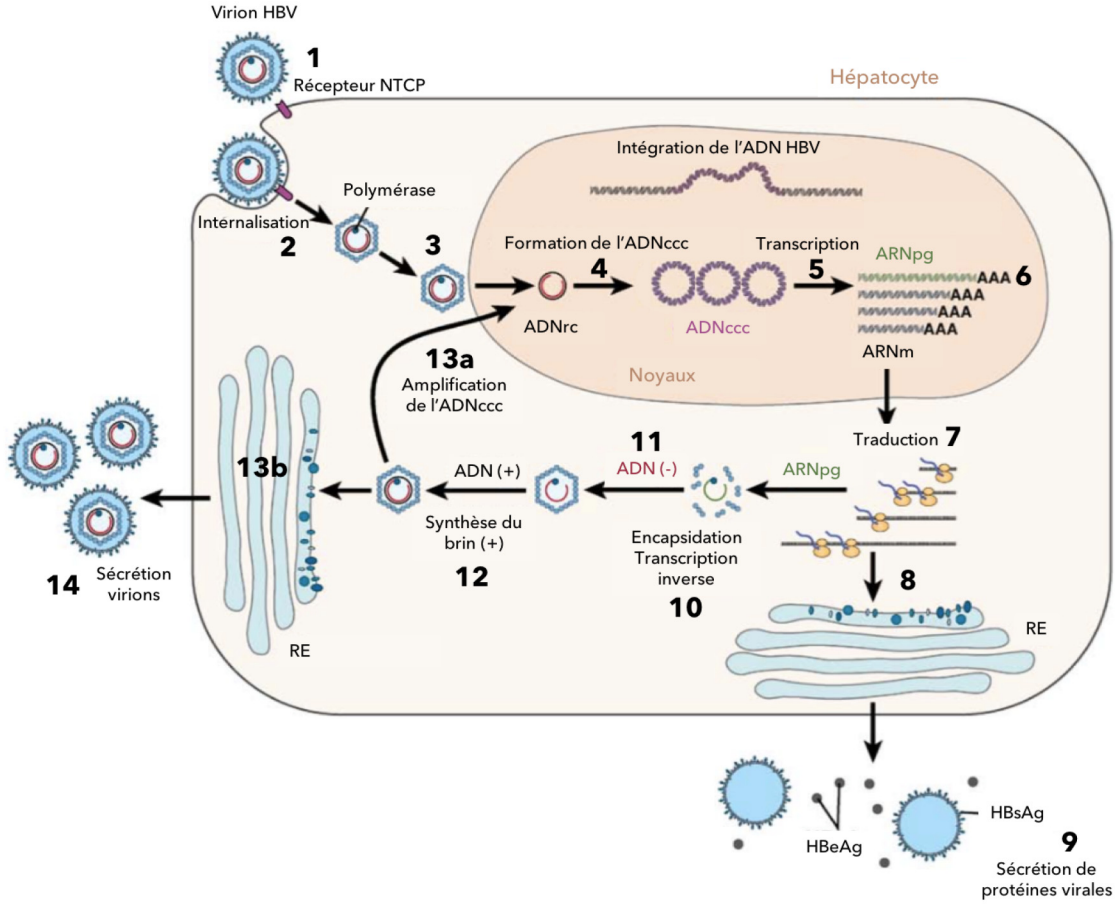


Figure 12 **Cycle de réplication du virus HBV**

Les différentes étapes clés de la réplication du virus sont indiquées par les chiffres noirs et correspondent aux paragraphes du texte. RE= Réticulum endoplasmique
Figure adaptée de [41]

covalente des deux extrémités entre elles pour chacun des brins, serait réalisée par des enzymes cellulaires de réparation de l'ADN [15, 18].

5/ L'ADNccc sert de matrice pour la synthèse d'un ARN prégénomique (ARNpg), transcrit par une ARN polymérase II cellulaire (celle qui transcrit les ARNm cellulaires) à partir du brin (-). L'ADNccc est également la matrice des ARN subgénomiques (de tailles inférieures au génome). Tous les ARN viraux vont être cappés et exportés dans le cytoplasme. Par comparaison avec les rétrovirus, c'est donc l'ADNccc qui sert de matrice et HBV, au contraire des rétrovirus, n'a pas besoin d'être intégré dans le génome cellulaire. Les évènements d'intégration sont tout de même possibles et très fréquemment retrouvés dans les tumeurs associées au HBV. L'ADNccc pose les mêmes problèmes que l'ADN intégré des rétrovirus en matière de persistance et de traitements.

6/ L'ARN prégénomique synthétisé sert notamment de matrice pour la synthèse de l'antigène HBc et de la polymérase, mais aussi pour la rétrotranscription en ADN viral.

7/ En parallèle, les petits ARNm viraux sont transcrits et exportés dans le cytoplasme. Ils sont, par la suite, traduits en protéines virales (HBs et HBx).

8/Les protéines d'enveloppe, l'antigène HBe et PréC sont dirigés vers le réticulum endoplasmique (RE).

9/ L'antigène HBe et les particules subvirales vides sont sécrétés.

10/ De leur côté, l'ARN prégénomique et la polymérase sont recrutés dans les capsides néoformées par la protéine HBc. La liaison entre l'ARNpg et la protéine P est médiée par le signal d'encapsidation ε porté par l'ARNpg.

11/ L'interaction entre l'ARNpg, la polymérase et HBc est nécessaire à l'initiation de la transcription inverse. Le brin long d'ADN (-) est synthétisé dans la capside par l'ADN polymérase virale (étape apparentée au cycle de réplication des rétrovirus).

12/ La synthèse du brin court (+) débute ensuite à partir du brin (-) d'ADN qui vient d'être formé donnant naissance aux nouvelles molécules d'ADNrc. Il existe différentes formes d'ADNrc en fonction de la longueur synthétisée du brin (+). Plusieurs hypothèses tentent d'expliquer ces longueurs variables, soit par l'absence d'accès aux dNTPs lors de la fermeture de la capside, soit par un espace insuffisant dans la capside pour permettre de poursuivre la synthèse du brin (+) [18].

13/ Les nucléocapsides ont deux devenirs : [46]

a/Une minorité va être recyclée vers le noyau pour maintenir le pool d'ADNccc.

b/L'autre partie, majoritaire, va être envoyée vers le réticulum endoplasmique pour être enveloppée de protéines HBs. Comme cité précédemment, la double topologie de PréS1 permet l'enveloppement des nucléocapsides formées.

14/Les particules virales infectieuses sont sécrétées à leur tour.

Le génome de HBV peut également être intégré dans le génome cellulaire. Ce processus semble facilité par des cassures doubles brins dans l'ADN génomique car HBV ne code pas pour des intégrases. L'intégration du génome n'est pas nécessaire à la réplication du virus, c'est un évènement rare lors d'une infection transitoire, seulement 0,1 à 0.01% d'hépatocytes. Cependant, au cours du temps chez les patients atteints de CHC il est possible de retrouver entre 10 % et 100% de cellules avec une intégration du génome [47]. Le site d'intégration du génome de HBV semble aléatoire, il n'est pas confiné à un chromosome particulier, ni proche d'oncogène connus [15, 48]. Généralement, le génome de HBV n'est pas intégré en entier (dans la majorité des cas on retrouve les gènes HBx et PréS), dans environ 40% des cas, l'insert de HBV est situé entre l'enhancer viral et les ORF des gènes X ou C. Ainsi cette intégration peut conduire à l'expression de protéines virales dans les hépatocytes telles que la protéine préS/S tronquée ou non et des formes mutées ou tronquées de HBx qui vont déstabiliser de nombreuses voies cellulaires.

I.3. Le minichromosome viral : l'ADNccc

La plupart des virus à ADN exploitent la machinerie cellulaire pour permettre leur amplification et leur survie. Les rétrovirus s'intègrent dans le génome cellulaire de façon à être répliqué en même temps que les chromosomes de l'hôte. Pour les *hepadnavirus*, l'intégration est plus rare et le génome persiste sous une forme épisomale, circulaire, clos de façon covalente, l'ADNccc. Cet ADN ne comporte pas d'origine de réplication (ORI), il n'est donc pas répliqué par les polymérases cellulaires lors de la mitose comme le sont d'autres virus à ADN épisomal. Lors de la division cellulaire, il n'est pas dupliqué mais transmis aux cellules filles par diffusion passive. La régénération du foie au cours du temps implique de nombreuses divisions cellulaires. L'ADNccc devrait donc être, à long terme, dilué puis perdu. Le recyclage des nucléocapsides et une re-infection des nouvelles cellules expliquerait la surprenante persistance de cet ADNccc, même en absence de réplication virale due aux traitements antiviraux.

L'ADNccc est donc à l'origine de la persistance du virus lors de l'infection chronique et de la récurrence rapide de la réplication du HBV lors de l'arrêt des traitements antiviraux [49], mais aussi chez les porteurs sains, inactifs ou les patients en immunodépression lors de chimiothérapies ou de l'utilisation de stéroïdes.

I.3.1. La formation de l'ADNccc

Comprendre et étudier la formation de l'ADNccc n'est pas facile car les modèles d'études ne sont pas optimaux. En particulier, la présence en très large excès d'ADNrc rend l'utilisation des approches de PCR difficile à mettre en place. La réparation de l'ADNrc pour former un ADNccc reste la source de nombreuses questions.

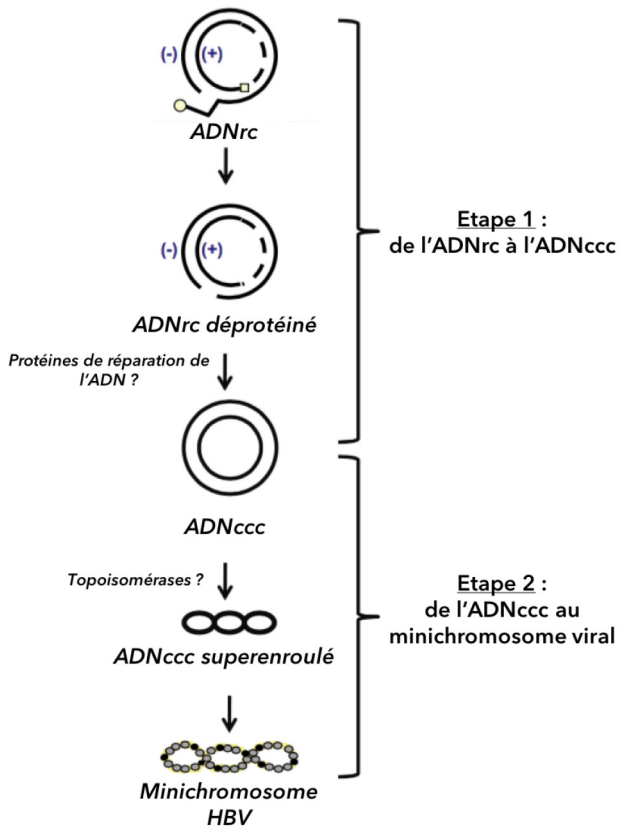


Figure 13 **Schématisation de la conversion de l'ADNrc en minichromosome viral**

Le passage de l'ADNrc en minichromosome viral requière 2 étapes majeures, la réparation de l'ADNrc en ADNccc puis le superenroulement d'ADN circulaire pour former le minichromosome viral. Les acteurs cellulaires intervenant dans ce processus ne sont pas bien définis. Figure adaptée de [52]

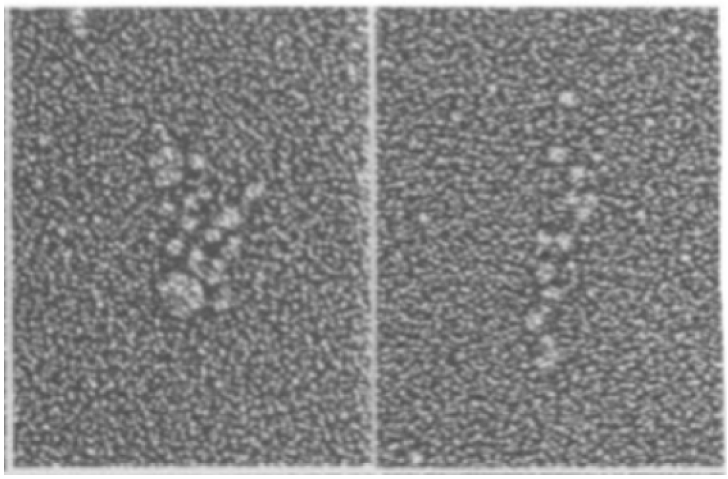


Figure 14 **Image au microscope électronique de l'ADNccc**

Exemples représentant la structure typique en « perles sur un fil » de l'ADN circulaire. Images tirées de [53]

D'un point de vue biochimique la formation de l'ADNccc à partir de l'ADNrc requiert plusieurs étapes importantes, cependant les différents acteurs qui interviennent dans ce processus ne sont pas tous bien définis : (FIGURE 13)

a. La suppression de la polymérase virale attachée de façon covalente à l'extrémité 5' du brin (-) de l'ADNrc produisant un ADNrc déprotéinisé. Des études contradictoires suggéreraient le rôle de la tyrosyl-DNA phosphodiesterase (TDP)2 dans le détachement de la polymérase virale [50].

b. La suppression, à l'extrémité 5' du brin (+), de l'oligomère d'ARN utilisé en tant que primer lors de la synthèse du brin (+).

c. La suppression précise d'une des séquences répétées DR sur le brin (-).

d. La complétion du brin (+) par la machinerie cellulaire, faisant sans doute intervenir des enzymes de réparation de l'ADN. Certaines études ont suggéré l'intervention de la polymérase virale à cette étape [51].

e. La ligation des deux brins d'ADN pour former l'ADN circulaire clos de façon covalente.

f. L'ADNccc est superenroulé (action des topoisomérases ?) et forme un minichromosome en s'associant avec des nucléosomes.

La quantité d'ADNccc dans la cellule infectée reste en débat, notamment parce qu'elle expliquerait le maintien de cet ADN après de multiples divisions cellulaires. Les premières études sur le DHBV ont pu montrer jusqu'à 50 copies d'ADNccc par cellules en raison notamment d'un phénomène de recyclage des nucléocapsides très important chez le canard [18]. Cependant l'étude du HBV *in vivo* ne permet pas de détecter plus de quelques copies d'ADNccc. De même, dans les lignées de cellules infectées, il n'y a pas plus de 1 ou 2 copies d'ADNccc par cellule.

I.3.2. La composition de l'ADNccc

La forme épisomale de l'ADN viral de HBV et de tous les *hepadnavirus*, est caractérisée par une structure en minichromosome. C'est à dire un ADN associé à des histones cellulaires formant des nucléosomes de la même manière que l'ADN génomique de la cellule hôte.
Cette organisation autour de nucléosomes est retrouvée chez d'autres virus tels que le polyoma virus, le virus simien SV40, les papillomas virus humains HPV et bovins BPV, les adénovirus (AAV), le virus Epstein-Barr[3] (EBV) et le virus Herpes simplex 1[4] (HSV1). [52]. L'observation par microscopie électronique de l'ADNccc montre une structure en « perles sur un fil » caractéristique de cette organisation en nucléosomes [53] [54]. (FIGURE 14)

L'organisation en minichromosome permet de compacter l'ADN et de réguler la transcription. Les histones entrant dans la composition d'un nucléosome peuvent subir des modifications post traductionnelles jouant un rôle actif ou répressif dans les évènements de

[3] Virus EBV : Herpesvirus fréquemment retrouvé chez l'homme, il infecte les lymphocytes B et est associé avec la survenue de divers lymphomes.

[4] HSV1 : Herpesvirus, fréquent chez l'homme, l'infection se traduit par des plaies sur la peau, il est connu pour ses périodes de réactivation au cours de la vie de l'individu

Tableau 3 **Types, marques et fonctions des modifications de la chromatine**

Modifications de la chromatine			
Marques (sur l'ADN ou les histones)		Sites	Fonction
Méthylation de l'ADN	Cytosines méthylées (meC)	îlots CpG	Répression
Modifications post traductionnelles des histones	Lysines acétylées (K Ac)	H3 (9,14, 18, 56) H4 (5,8,13, 16) H2A, H2B	Activation
	Sérines/Thréonines phosphorylées (S/T)	H3 (3, 10, 28) H2A, H2B	Activation
	Arginines méthylées (R Me)	H3(17,28) H4 (3)	Activation
	Lysines méthylées (K Me)	H3 (4, 36, 79)	Activation
		H3 (9, 27) H4 (20)	Répression
	Lysines ubiquitunées (K Ub)	H2B (120)	Activation
		H2A (119)	Répression
	Lysines sumoylées (K Su)	H2B (6/7) H2A (126)	Répression

Les nombres entre parenthèse indiquent les résidus des acides aminés touchés par les modifications.
Tableau adapté de [52]

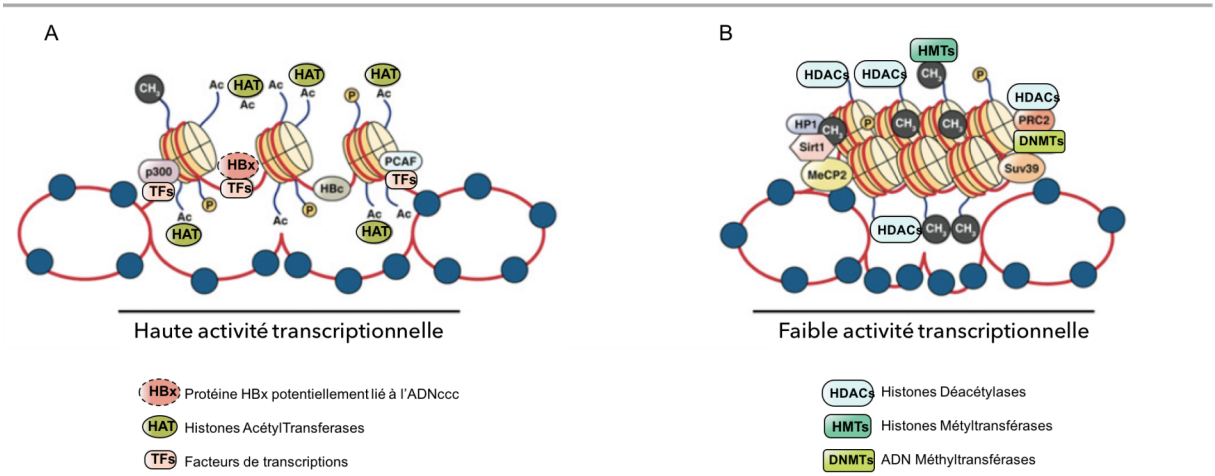


Figure 15 **Régulation épigénétique de l'ADNccc**

ADNccc associé à une forte (A) ou une faible (B) réplication en fonction des modifications épigénétiques et des protéines associées.
Figure adaptée de [59]

transcription. Deux formes de minichromosomes chez les *Hepadnavirus* ont été observées, plus ou moins conformées autour des nucléosomes, ces changements dynamiques reflètent la régulation de la transcription de ces ADN [54].

Les nucléosomes chromatiniens sont formés par un octamère d'histones (H2A-H2B-H3 et H4) autour duquel s'enroule l'ADN. L'histone H1 est présente sur l'ADN entre deux nucléosomes. Les mêmes histones sont présentes sur l'ADNccc [55].

Le minichromosome d'HBV est composé à la fois d'histones et de protéines non-histones. La protéine HBc se lie préférentiellement à l'ADN double brin et joue notamment un rôle important dans la compaction de l'ADN viral [45]. De plus, un grand nombre de facteurs de transcription permettent la régulation de cet ADN viral [56], ainsi que des facteurs impliqués dans les modifications post traductionnelles des histones [55].

I.3.3. La régulation de l'activité de l'ADNccc

I.3.3.a. Régulation épigénétique de l'ADNccc

La transcription de l'ADNccc est contrôlée par de nombreuses régulations épigénétiques. Au même titre que la chromatine de l'hôte, ces modifications épigénétiques peuvent intervenir au niveau de l'ADN ou au niveau des histones.

La méthylation de l'ADNccc au niveau des îlots CpG est associée à la réduction du taux de transcription *in vitro* et *in vivo*. Le statut de méthylation pourrait donc être associé à l'évolution et à la sévérité de la maladie hépatique [57].

Les modifications post traductionnelles (PTM) des histones sont essentielles à la régulation des gènes cellulaires. Elles sont très nombreuses et peuvent être des acétylations, des méthylations, des phosphorylations, des ubiquitinations ou des sumoylations [52]. Ces PTM peuvent influencer la compaction de l'ADN, au niveau des régions promotrices des gènes, elles participent à la régulation de la transcription en recrutant des protéines spécifiques, ou en modifiant directement les propriétés physiques des nucléosomes ou niveau de l'interaction entre les histones et l'ADN [58]. On considère qu'une augmentation de l'acétylation des histones est associée à une initiation de la transcription, alors que la réduction de l'acétylation permet le recrutement de méthyltransférases, qui vont méthyler les histones (notamment H3 et H4), ainsi que l'ADN, et donc réprimer la transcription [52]. (TABLEAU 3)

Ces modifications post traductionnelles au niveau des histones sont médiées par des histones deacétylases ainsi que des histones acétyltransférases. L'ADNccc est enroulé autour d'histones cellulaires qui peuvent subir les mêmes types de PTM. Des expériences de ChIP sur l'ADN viral, introduit par transfection, ont permis d'identifier que la réplication de HBV était associée à l'acétylation des histones H3 et H4 par des enzymes connues pour réguler le génome. On retrouve notamment les acétylatransférases p300, CBP ou au contraire l'histone deacétylase HDAC1. Les systèmes de régulation épigénétique de la cellule hôte permettent donc de moduler l'ADN viral [55]. (FIGURE 15)
Un grand nombre d'autres facteurs de transcription ont été également retrouvés associés à l'ADN viral dont : CREB, ATF, STAT1 and STAT2. [52]

Ces modifications épigénétiques sont des phénomènes très dynamiques qui peuvent varier en fonction du contexte cellulaire et orienter vers une activation ou une inhibition de la transcription des gènes viraux.
L'ordre d'apparition des modifications épigénétiques reste en débat : l'ouverture de la chromatine pourrait permettre la fixation de l'ARN polymérase qui, à son tour, permet d'ouvrir un peu plus la chromatine pour la rendre accessible aux facteurs de transcription.

I.3.3.b. Modulation de l'activité de l'ADNccc

En dehors des modifications épigénétiques, d'autres facteurs cellulaires et viraux peuvent également moduler l'activité de l'ADNccc.
Les microARN, qui représentent une classe de petits ARN non codants, sembleraient être impliqués dans cette régulation. D'une part, leur expression peut être affectée par HBV ; d'autre part, certains microARN pourraient également inhiber directement ou indirectement la réplication d'HBV [60].

Certains facteurs de l'immunité seraient également impliqués dans la régulation de l'ADNccc, les interférons de type I et le TNFα permettent de supprimer la réplication virale de façon non cytolytique et contribuent à diminuer le réservoir d'ADNccc [12].

Les facteurs viraux influencent également le minichromosome viral : ainsi l'absence de la protéine sécrétée HBeAg serait corrélée avec une diminution de la transcription virale [52]. Les protéines HBc [61] et HBx jouent aussi un rôle important.
L'infection *in vitro* avec un virus HBV muté pour l'expression d'une protéine HBx fonctionnelle conduit à la formation d'un ADNccc mais celui-ci est inactif transcriptionnellement. Les mécanismes conduisant à l'inhibition de l'ADN viral ne sont pas bien décrits. En revanche en l'absence de HBx, l'ADN viral est porteur de marques épigénétiques répressives [62]. La nécessité de HBx dans la régulation de l'ADNccc sera étudiée dans un paragraphe ultérieur.

Il est important de prendre en compte que les données publiées avant le début de ma thèse ont été obtenues dans des modèles utilisant la transfection de l'ADN viral et non dans des modèles reflétant une infection virale. Dans l'étude 1 de ce manuscrit, nous confirmons les résultats concernant la régulation épigénétique de l'ADNccc dans des conditions d'infection *in vitro*.

I.4. Modèles d'étude pour HBV

Les modèles de culture cellulaire ont permis de décrypter les mécanismes principaux de la réplication virale et de développer de nouveaux agents antiviraux, mais les modèles animaux sont aussi nécessaires pour comprendre les interactions complexes entre le virus et son hôte. Bien qu'il existe aujourd'hui des modèles cellulaires capables de supporter toutes les étapes du cycle viral, les modèles animaux supportant l'infection par HBV sont toujours manquants [63].
Le HBV n'infectant que l'homme et les grands singes (chimpanzés, orangs outangs, gorilles), il est difficile d'avoir accès à un modèle d'étude pertinent *in vivo*.
D'un point de vue *in vitro*, les choses sont aussi compliquées car jusque dans les années 2000 il n'existait pas de modèle cellulaire permissif à une infection par HBV. Avant cette date, l'essentiel des données a été obtenu dans le modèle du canard *in vitro* et *in vivo* et extrapolé au virus humain, sans toujours tenir compte des différences entre HBV et DHBV et donc entre les mammifères et les espèces aviaires. De plus, l'absence de gène HBx dans DHBV explique, en particulier, toutes les difficultés à connaitre le rôle précis de HBx, malgré tous les travaux et publications portant sur ce sujet.

I.4.1. Les modèles animaux

Etudier tous les aspects du cycle viral, comprendre les mécanismes de l'immunité mis en jeu et tester de nouvelles molécules thérapeutiques nécessitent d'avoir des modèles d'études animaux optimaux. Or à ce jour, aucun modèle n'est capable à la fois de reproduire toutes les étapes d'une infection HBV, d'avoir une réponse immunitaire similaire à celle de l'homme et de servir de modèle à l'hépatocarcinogénèse induite par HBV.

Le virus de l'hépatite B infecte l'homme et les chimpanzés. Différents grands singes comme les gorilles et les orangs outangs sont infectés par des virus proches. Les chimpanzés ont été utilisés pour comprendre d'importants aspects concernant l'interaction virus/hôte et l'immunologie associée, cependant leur utilisation a toujours été très restreinte et est aujourd'hui complètement interdite dans de nombreux pays.
HBV peut aussi infecter les macaques (Macaca fascicularis) [64], ces animaux sont disponibles en élevage et sont déjà utilisés en laboratoire, notamment par notre équipe pour l'étude de HBV. En effet, une souche de HBV humain a été identifiée chez les macaques et est capable d'infecter des macaques naïfs. Le Tupaïa (mammifère se rapprochant d'un écureuil), en condition de laboratoire, est également permissif à une infection, cependant les taux d'infection sont faibles, il est donc difficile d'en faire un bon modèle étude *in vivo* [65].

Mais d'autres types d'*hepadnavirus* peuvent infecter d'autres espèces animales telles que le canard ou la marmotte. Ces autres *hepadnavirus* ont depuis longtemps été utilisés pour comprendre des mécanismes tels que la réplication du virus, l'entrée du virus ou leur rôle dans la carcinogénèse. Cependant, la pathologie de l'infection et même de l'évolution vers le CHC ne reposent pas sur les mêmes mécanismes que pour le virus humain, cela entraîne des limitations dans leur utilisation à des fins de recherche thérapeutique.
Grâce au modèle du canard, Summers, Mason et Taylors ont pu mettre en évidence la transcription inverse présente chez les *hepadnavirus* [66, 67] et la présence d'un minichromosome, l'ADNccc, en tant que matrice pour la synthèse des ARN viraux [53, 54].

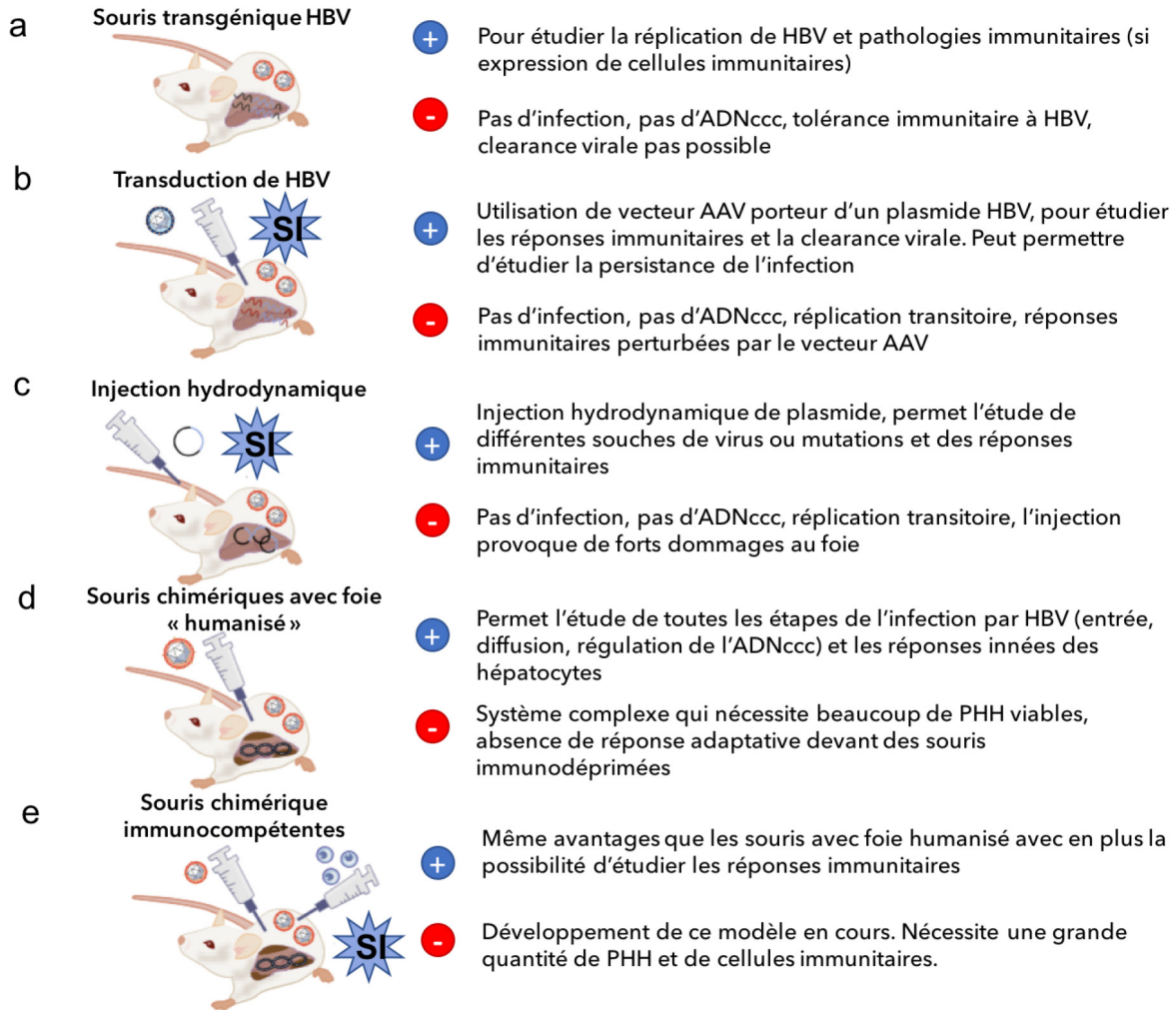


Figure 16 **Avantages et inconvénients des différents modèles de souris**

SI = Système Immunitaire effectif. Figure adaptée de [50]

Chaque modèle ayant ses limitations, ces modèles sont donc complémentaires et l'utilisation de leurs cellules primaires peut être une bonne alternative pour pallier aux faibles modèles cellulaires existant en dehors de l'utilisation de hépatocytes primaires humains (PHH). (TABLEAU 4)

Tableau 4 **Résumé des différents modèles animaux disponibles et leurs caractéristiques**

Modèle animal	Virus	Persistance du virus	Elimination possible	Compétence immunitaire	ADNccc nucléaire
Chimpanzé	HBV	Oui	Oui	Oui	Oui
Souris avec foie "humanisé"	HBV	Oui	Oui	Non	Oui
Souris transgénique HBV1.3	HBV	Intégration	Non	Forte tolérence à HBV	Non
Souris infectée avec adénovirus HBV	HBV	Dépendant de la dose	Oui	Oui	Non
Souris infectée avec AAV HBV	HBV	Oui	Oui	Oui	Non
Injection hydrodynamique de plasmide HBV	HBV	Non	Oui	Oui	Non
Injection hydrodynamique de HBVcircle	HBV	Oui	Oui	Oui	Oui mais substitut
Marmotte	WHV	Si infection néonatale	Oui	Oui	Oui
Canard	DHBV	Si infection néonatale	Oui	Oui	Oui
Macaque exprimant NTCP	HBV	Inconnu	Oui	Oui	Oui
Cochon exprimant NTCP	HBV	Inconnu	Oui	Oui	Oui

Adapté de [63]

Le modèle de la souris est une piste intéressante et de nombreuses équipes ont cherché à développer de nouveaux modèles murins. L'inconvénient de ces approches repose essentiellement sur l'absence de la matrice naturelle de la transcription, l'ADNccc.

Des souris transgéniques compétentes pour la réplication du virus linéarisé ont permis de comprendre certains mécanismes immunitaires mais l'ADN viral ne peut pas être éliminé dans ce modèle [68] (FIGURE 16A). L'utilisation de vecteurs AAV pour transférer le génome du virus permet d'initier la réplication mais il n'est pas possible d'étudier toutes les étapes de l'infection et des réponses immunitaires [69]. (FIGURE 16B)
L'injection hydrodynamique de plasmides porteurs du génome de HBV, permet l'étude de nombreuses souches de virus et de mutations ponctuelles. Cependant l'entrée des vecteurs par injection hydrodynamique provoque des dommages importants au niveau du foie. (FIGURE 16C)

Les souris « humanisées » ont également servi de modèle d'étude, il s'agit de souris immunodéficientes croisées avec des souris exprimant un transgène toxique pour le foie. Le foie détruit de la souris peut être repeuplé avec des hépatocytes humains (ou d'autres espèces) qui supportent l'infection [70]. Mais, comme pour les autres modèles celui-ci a des failles puisque les approches thérapeutiques ne peuvent pas être abordées en absence de système immunitaire [63]. (FIGURE 16D ET E)

Récemment l'équipe de Yan et al. [71] a établi un modèle de transcription dépendent de l'ADNccc. Pour cela, ils ont utilisé la technologie des « minicircle » permettant de produire de l'ADN circulaire dépourvu d'ADN plasmidique. Le vecteur est ainsi moins perçu comme ADN étranger par la cellule. Le HBVcircle mime un ADNccc et peut persister à long terme dans la cellule de souris. Cependant, comme pour tous les vecteurs, son entrée dans la cellule requiert une injection hydrodynamique qui affecte les fonctions biologiques du foie. De plus, il s'agit encore une fois d'un modèle incomplet puisqu'il n'est pas possible d'étudier la conversion de l'ADNrc en ADNccc dans cette approche.

Enfin, depuis la découverte du récepteur d'entrée du virus, le récepteur NCTP [44] l'idée de complémenter les modèles animaux avec ce récepteur est apparue. Récemment, Lempp et al. [72] ont montré que l'ajout du récepteur NCTP dans des hépatocytes de souris, rat ou chien, conduit à des cellules permissives pour le virus HDV mais pas pour HBV. Ce qui indique que la réplication de HBV nécessite des facteurs cellulaires de l'hôte spécifiques et absents dans ces espèces. Au contraire, les hépatocytes de cochons et de macaques cynomolgus ou rhesus peuvent supporter le cycle de réplication viral au complet [72].
Ces espèces pourraient donc être utilisées à l'avenir comme de nouveaux modèles d'étude [63].

I.4.2. Production de particules virales

Pour étudier l'infection du virus dans des modèles permissifs il est nécessaire d'avoir accès à des particules virales infectieuses. Deux options existent : le sérum de patients infectés ou la production de particules virales *in vitro*.
Les cellules HepG2, issues d'un hépatoblastome, ont été transfectées avec un plasmide portant 4 copies en tandem du génome de HBV (génotype D) ainsi qu'un gène de résistance au G418. Le clone 2215 a été sélectionné car il pouvait produire de grandes quantités d'antigènes HBe et HBs. Ces cellules sécrètent également dans leurs surnageants des particules de Dane et des particules virales non infectieuses. Ce modèle a été utilisé pour analyser les différentes étapes du cycle de réplication [73] et la recherche d'inhibiteurs au niveau de la polymérase virale. Ces études ont donné naissance aux antiviraux actuels, les analogues de nucléos(t)ides qui bloquent la transcription inverse.
Aujourd'hui le système des HepG2 2215 permet, entre autres, de produire de l'inoculum infectieux utilisé pour infecter des cultures de cellules. Le modèle des HepAd38 peut également être utilisé, il s'agit d'un modèle inductible à la tétracycline qui sécrète des particules virales dans le surnageant [74]. Les conditions de culture pour produire suffisamment de particules virales infectieuses pour la préparation d'un inoculum viral nécessitent la présence de DMSO (2%) et d'une faible concentration en sérum de veau fœtal (5%) [75].

Pour étudier le rôle de HBx dans un contexte d'infection, un modèle de HepG2 H1/3Dx (aussi appelée HepG2 K6) a été développé. Il s'agit d'une lignée avec l'intégration stable de 1,3 fois le génome de HBV (génotype D) qui porte une mutation engendrant un codon stop prématuré dans les ORF 3' et 5' de HBx [76]. A la manière des HepG2 2215, la G418 permet la sélection des clones.
Cette lignée produit des protéines virales infectieuses même en l'absence de HBx. Ce qui suggère que HBx n'est pas indispensable à la réplication virale initiée à partir de l'ADN viral intégré, alors qu'elle est nécessaire pour la transcription de l'ADNccc comme il l'a été démontré avec le même type de construction dans des cellules HepaRG ([77] et l'étude 2 de ce manuscrit). Ces virions sont capables d'infecter des hépatocytes en culture. Leur utilisation pour l'infection de souris avec un foie humanisé n'est pas très bien connue mais il semblerait que la mutation dans la séquence de HBx soit rapidement corrigée chez les souris ne permettant pas l'étude de l'absence de HBx. (Données personnelles, S. Urban, Heidelberg, Allemagne).

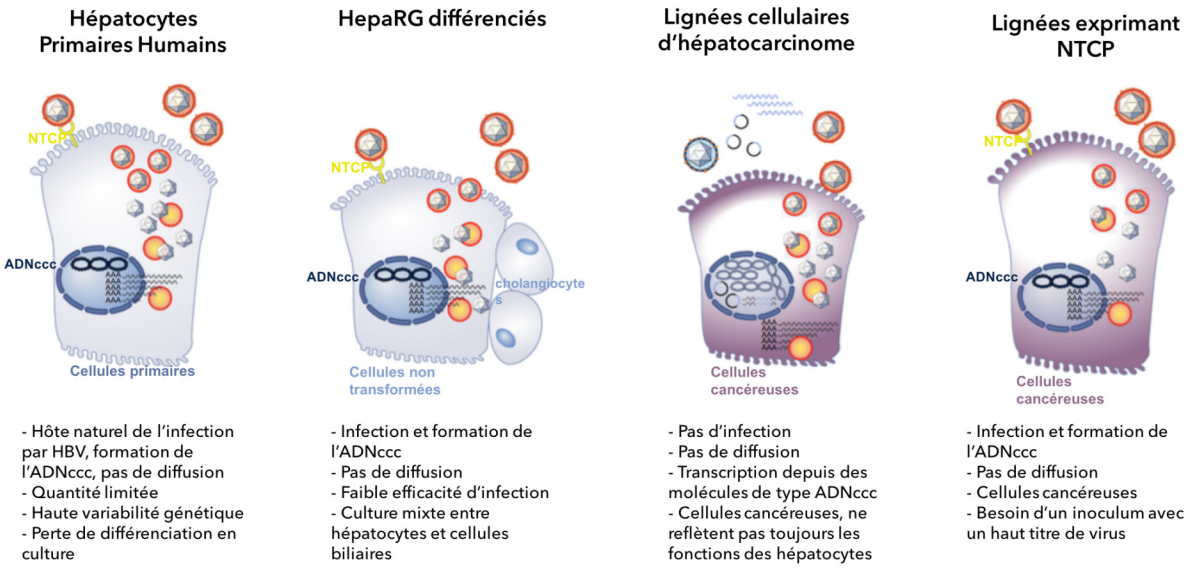


Figure 17 **Résumé des cellules humaines les plus couramment utilisées pour étudier l'infection par HBV**

Figure adaptée de [50]

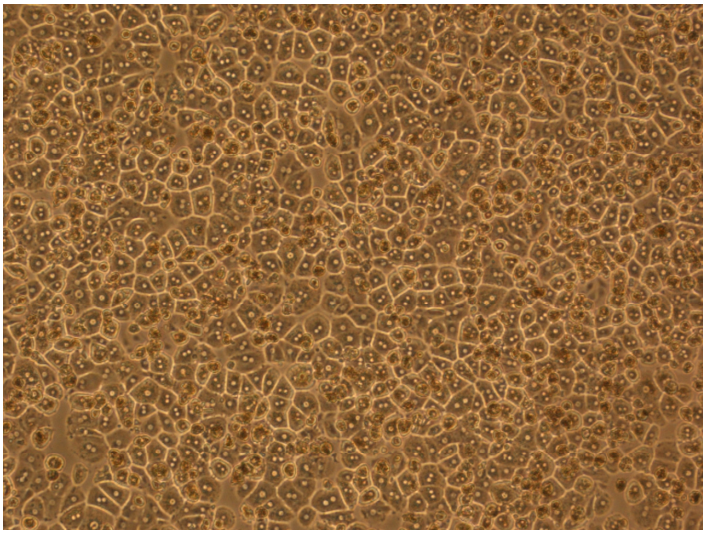


Figure 18 **Photographie de PHH en culture**

PHH photographiés en lumière blanche objectif x10 le lendemain de leur extraction d'une résection de foie humain.

I.4.3. Modèles cellulaires

I.4.3.a. Les PHH

Les hépatocytes primaires humains (PHH, Primary Human Hepatocytes) ont pendant longtemps été les seules cellules infectables *in vitro*. (FIGURE 17 FIGURE 18) et restent le modèle d'étude le plus pertinent. Ces cellules primaires sont susceptibles à l'infection et peuvent être utilisées pour étudier tous les aspects du cycle viral : l'entrée du virus (les PHH hautement différenciées expriment le récepteur NTCP sur leur membrane baso-latérale [78]), la formation et la transcription de l'ADNccc, l'expression des protéines virales et la sortie du virus. Néanmoins dans les conditions de cultures actuelles les PHH ne peuvent être cultivées plus de 20 jours, dans ce cas, aucune diffusion de l'infection n'est observée, le surnageant de culture n'est pas infectieux.
Cependant les PHH sont rares, elles sont isolées depuis des résections de foies de patients et elles peuvent rapidement perdre leur statut de différenciation après la mise en culture [79]. Une des conditions de culture importante repose sur la concentration en DMSO dans le milieu de culture (supérieur à 2%) qui favorise et maintient le statut différencié des hépatocytes. Or la perte de différenciation entraine une diminution de l'expression du récepteur NTCP et donc affecte la susceptibilité à l'infection. Dans de bonnes conditions de cultures et sur des préparations de cellules correctes, jusqu'à 100% de cellules peuvent être infectées.

Les PHH sont des cellules primaires, elles ne sont donc pas transformées et sont, comme toutes cellules primaires, d'une durée de vie limitée, environ 15 à 20 jours dans les conditions de cultures appropriées.

Les différents donneurs depuis lesquels les PHH sont isolées induisent une variabilité [80] génétique importante qui peut se refléter sur la qualité des cellules et leur capacité à être infectées. Mais la variabilité génétique apporte également plus de poids aux résultats scientifiques lorsque ceux-ci sont reproduits sur plusieurs lots de PHH. Pour limiter cette variabilité certaines études ont montré l'utilisation de cellules souches pluripotentes différenciées en hépatocytes, les iHeps [81].

Les PHH sont un bon modèle pour étudier le métabolisme et les traitements à différents niveaux du cycle viral et notamment au niveau de l'entrée du virus. C'est en effet l'étude des PHH qui a permis l'identification du récepteur d'entrée, le récepteur NTCP [78]. Pour améliorer les conditions de culture et limiter la dédifférenciation plusieurs protocoles ont été proposés [82] dont des variations du pourcentage de DMSO, les cultures 3D ou les co-cultures avec des cellules du foie non parenchymateuses. Les premiers modèles de co-cultures pour l'étude du DHBV reposaient sur la culture simultanée d'hépatocytes de canard et de cellules épithéliales de rat [83]. Récemment, une étude a montré l'utilisation de co-culture dans laquelle les hépatocytes sont organisés en colonies entourées par des cellules stromales permettant le maintien du phénotype et les fonctions des PHH pendant une plus longue période [84].

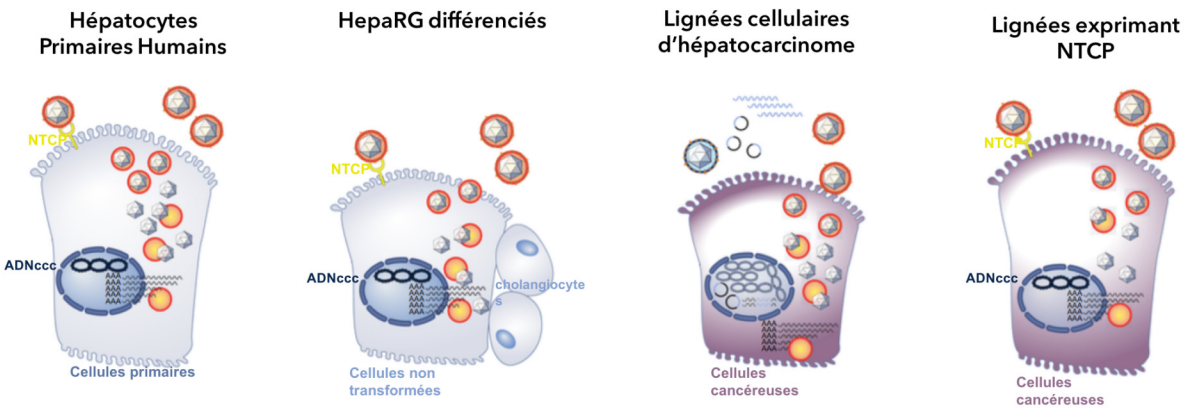


Figure 17 **Résumé des cellules humaines les plus couramment utilisées pour étudier l'infection par HBV**

Figure adaptée de [50]

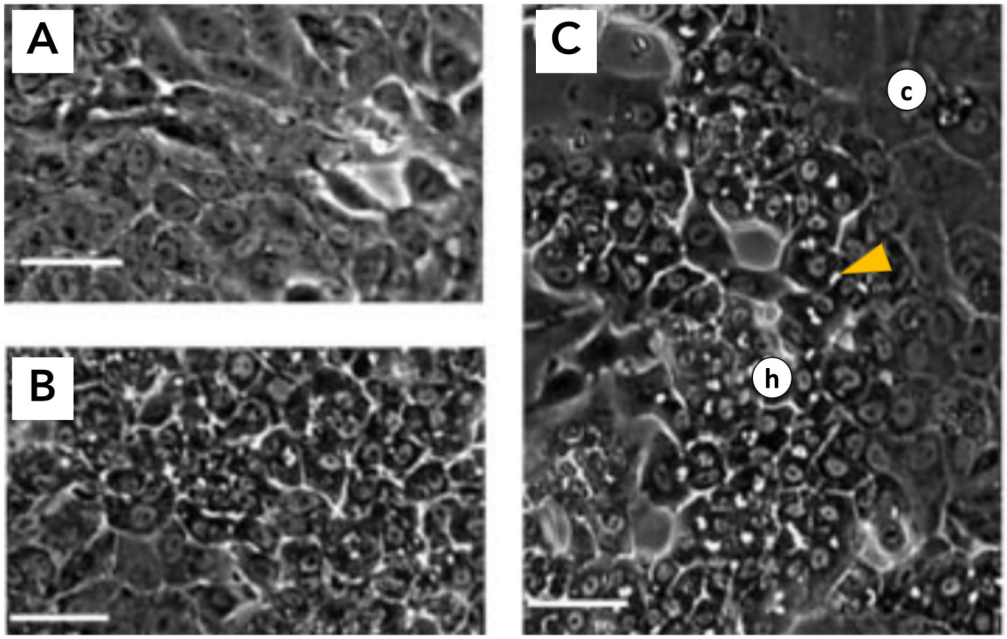


Figure 19 **Culture de cellules HepaRG à différents stades de différenciation**

(A) Cellules en prolifération
(B) Cellules maintenues en culture pendant 30 jours sans DMSO
(C) Cellules maintenues en culture pendant 15 jours sans DMSO puis 15 jours avec DMSO. h=hépatocytes, c=cholangiocytes, la flèche indique un canalicule biliaire
Figure issue de [85]

I.4.3.b. Les HepaRG

La lignée de progéniteurs hépatocytaires, les HepaRG a été isolée en 2002 à partir d'une tumeur de foie associée à une infection par le virus HCV [85]. Cette lignée est permissive à une infection par le virus HBV après plusieurs semaines de culture dans des conditions spécifiques.

Les HepaRG sont des cellules bipotentes capables, en fonction des conditions de culture, de se différencier en hépatocytes et en cellules biliaires, les cholangiocytes. (FIGURE 17 FIGURE 19) Le protocole de différenciation des HepaRG est long et précis. En effet, les cellules restent à confluence pendant 15 jours avant l'ajout dans le milieu de culture de DMSO (1,8%) pendant à nouveau 15 jours afin de pousser les cellules à acquérir leur phénotype différencié. Les HepaRG différenciées (dHepaRG) peuvent être infectées *in vitro*. Tout le cycle viral a lieu dans ces cellules, de même que dans les PHH, mais, comme précédemment, aucune diffusion n'est observée. Cependant au contraire des PHH, le nombre de cellules infectées est faible (de l'ordre de 10 à 15%).

L'utilisation des HepaRG a mis en évidence une infection longue à s'établir et le fait qu'il n'y avait pas d'amplification de l'ADNccc dans ces cellules, contrairement aux observations chez le DHBV, le recyclage des capsides pour augmenter le pool d'ADNccc ne se fait pas dans les HepaRG [86].
Les dHepaRG expriment les mêmes récepteurs que les PHH principalement au niveau des récepteurs impliqués dans les réponses immunitaires faisant des HepaRG différenciées un bon modèle d'études pour les réponses innées.

Pour les HepaRG, comme pour les PHH, les conditions d'infection sont importantes et nécessitent la supplémentation du milieu avec du DMSO, de l'hydrocortisone et du PEG (polyéthylène glycol). En effet, le PEG favorise l'infection en augmentant la liaison entre les protéines de surface du virus et les HSPG à la surface de la cellule hôte.

I.4.3.c. Les lignées cellulaires d'hépatocarcinomes

A partir des années 80 et avant la découverte des HepaRG, la plupart des études ont été réalisées à l'aide de lignées de cancer du foie, notamment les HepG2 et les HUH7, qui supportaient la réplication de HBV après la transfection de l'ADN viral. (FIGURE 17) Ces lignées, facile d'entretien, ne peuvent pas être infectées « naturellement » en l'absence du récepteur NTCP, en revanche la machinerie cellulaire permet de transcrire des plasmides portant le génome entier de HBV suite à une transfection.[87] Il est aussi possible d'avoir des modèles avec le génome de HBV intégré dans le génome cellulaire, par exemple les HepG2 2215 [88].

Pendant près de 30 ans, ces modèles ont permis d'étudier les mécanismes de réplication et de morphogénèse du virus. Ces lignées sont capables de reproduire les étapes du cycle cellulaire et ont permis d'étudier, entre autres, l'intégration du virus [89] ou la production de particules virales [88, 90]. De plus, l'utilisation de vecteurs de type baculovirus [91] ou adénovirus portant le génome de HBV permet la formation de grande quantité d'ADNccc *in vitro*.

Ces approches ont permis de confirmer la forme de minichromosome de l'ADN viral et d'analyser par ChIP des protéines associées à l'ADNccc et impliquées dans la régulation épigénétique de celui-ci [62].

Cependant, ces lignées restent des cellules transformées et présentent des défauts génétiques. On peut notamment noter que ces cellules ne contiennent pas les taux normaux de facteurs de transcription spécifique du foie (HNF1, HNF3, HNF4, Oct ...). Ceci affecte la régulation de la transcription virale, les taux d'ARN viraux et de protéines correspondantes (différents par rapport aux PHH). Par conséquent, on retrouve, par exemple, un excès de production de capsides immatures dans ces lignées HepG2 et HUH7.

I.4.3.d. Les lignées cellulaires exprimant NTCP

Depuis la description du récepteur NTCP en tant que récepteur d'entrée du virus, de nombreuses lignées cellulaires issues d'hépatocarcinomes exprimant le récepteur NTCP ont été créées et ont démontré leur efficacité pour l'infection par HBV [50]. (FIGURE 17) La disponibilité de ces nouveaux modèles pourrait permettre d'accélérer l'identification de nouvelles thérapies et de comprendre les étapes précoces de l'infection par HBV, en effet même si les titres infectieux doivent être hauts, l'infection est efficace et il est possible d'obtenir des cultures avec 100% d'infection.
Les HepG2-NTCP ont notamment été utilisé pour décrire DDX3, comme facteur de restriction affectant la transcription de l'ADNccc [92] De plus, dans des études récentes, les cellules HepG2-NTCP ont permis de montrer la capacité d'inhibiteur d'entrée de certaines molécules, notamment la Cyclosporine A et ses dérivées [93].
Cependant, il ne faut pas oublier qu'il s'agit de lignées dérivées des lignées HepG2 qui présentent donc les mêmes défauts d'un point de vue génétique. Une observation personnelle au laboratoire montre que les cellules HepG2 NTCP infectées ne sécrètent que très peu d'antigènes HBs mais seulement de l'antigène HBe au contraire des HepaRG et PHH.

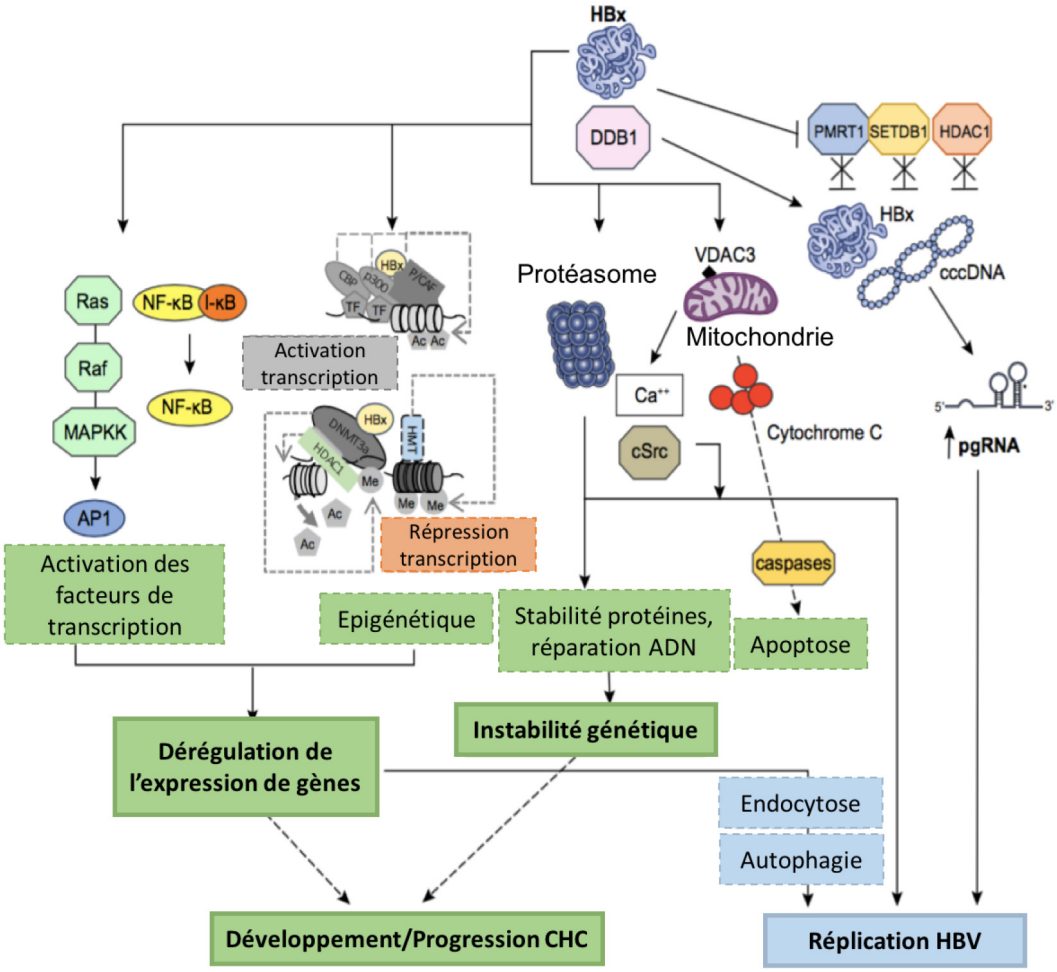


Figure 20 **Rôle de HBx dans la réplication de HBV et le développement du CHC**

On retrouve les deux grandes actions de HBx, d'un côté son implication dans le développement et la progression du CHC (en vert), de l'autre son importance dans la réplication de HBV (en bleu)
Figure adaptée de [94]

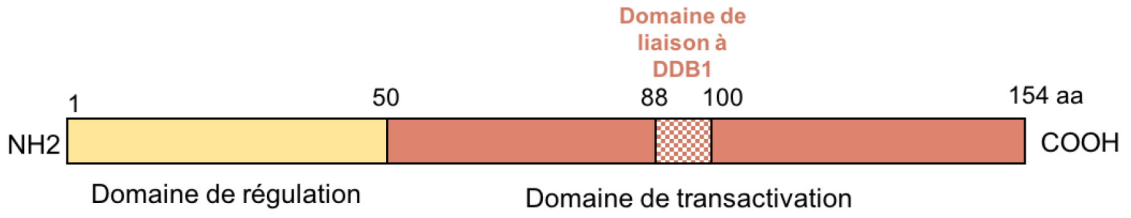


Figure 21 **Représentation de la séquence de HBx**

Les 153 aa de la protéine HBx sont conservés dans la plupart des hepadnavirus de mammifères. HBx est caractérisée par 2 domaines prédictifs, un domaine de régulation négative et un domaine de transactivation car on y retrouve des séquences capables d'interagir avec de nombreux partenaires cellulaires dont le domaine de liaison à DDB1 indispensable à la réplication virale.
Figure adaptée de [96]

II. La protéine HBx

La protéine HBx est très conservée parmi les *Hepadnavirus* des mammifères or, la plupart des mécanismes de réplication de HBV ont été acquis avec le modèle du DHBV qui n'a pas de protéine X individualisée. HBx est donc restée pendant longtemps un point d'interrogation. Il a fallu le modèle de la marmotte et WHx pour montrer que la protéine HBx avait un rôle important à jouer dans l'infection par HBV. D'après les nombreuses études sur le sujet, HBx est impliquée dans la réplication du virus mais aussi, de par son interaction avec de nombreux partenaires protéiques, dans un grand nombre de processus cellulaires, tels que : la transcription, les processus de réparation de l'ADN, la croissance, l'apoptose et le développement du CHC.

Comme le montre ce chapitre consacré à la protéine HBx, celle-ci a été pendant longtemps étudiée dans un grand nombre de modèles différents donnant naissance à de multiples fonctions pour HBx. Or, les effets associés à HBx varient en fonction du contexte cellulaire, de la quantité de HBx exprimée et du modèle choisi (expression de HBx seul ou dans un contexte de réplication de HBV par exemple).
Les effets de HBx sont multiples, ne sont pas tous bien décrits ni compris et laissent parfois sceptique pour les raisons exposées ci-dessus. On peut néanmoins les classer dans 2 grandes catégories, l'influence sur la réplication du virus et le rôle de HBx dans l'hépatocarcinogénèse. (FIGURE 20)

II.1. Structure

HBx est une protéine de régulation de 154 acides aminés ayant une masse approximative de 17 kDa. Il s'agit d'une des protéines les plus conservée parmi les différents sous types de HBV, elle est présente chez tous les *orthohepadnavirus* mais absente chez les *avihepadnavirus*. Peu de choses sont connues concernant la structure tridimensionnelle de HBx et ses propriétés biochimiques en raison de la difficulté de produire de la protéine HBx soluble en grande quantité.

Cette protéine comporte en N-terminal un domaine de régulation négative, en C-terminal un domaine de transactivation ou de coactivation.

Le gène comporte des régions hautement conservées (résidus 1–20, 58–84, and 120–140) espacées par des régions qui le sont moins (21–57, 85–119, and 141–154). Le domaine 88/100, peu conservé, est néanmoins requit pour l'interaction avec DDB1 (DNA Damage Binding Protein 1). Au sein de cette région on retrouve le domaine minimal en hélice conservé entre HBx, WHx et DDB2 et donc indispensable à l'interaction avec DDB1 [95]. (FIGURE 21)

Même la structure secondaire de la protéine HBx est source de désaccords entre les publications qui utilisent des modèles de productions différents. Ainsi, les cystéines de la région N-terminale pourrait être à l'origine de ponts disulfures et d'homodimérisation de la protéine [97]. Les données cristallographiques très limitées [98] et la découverte récente d'une

souche d'hépatite B chez les chauves-souris suggèrent cependant que la structure tridimensionnelle de la protéine HBx serait importante pour sa fonction.

La localisation de HBx fait également débat et semble être principalement liée à la quantité de protéine HBx exprimée ; dans le cas de cellules infectées, HBx est essentiellement nucléaire mais en cas de transfection et donc surexpression de la protéine celle-ci pourrait être à la fois nucléaire et cytoplasmique, ce qui pourrait expliquer les différentes activités connues de HBx [97]. Au cours du temps, la fraction cytoplasmique semble diminuer plus rapidement. On peut imaginer que le maintien de la fraction nucléaire est lié à son interaction avec DDB1 [99].
HBx semble soumise à différentes modifications post traductionnelles telles que la phosphorylation et l'acétylation mais encore une fois le modèle d'étude semble influencer ces modifications et l'intérêt de ces modifications n'est que partiellement décrit [97].

II.2. Nécessité de HBx pour la réplication

Comme déjà abordé dans le chapitre précédent HBx est indispensable à la réplication du virus. C'est en 1994, en étudiant le gène X chez la marmotte (WHx) que Zoulim et al. [100] ont démontré pour la première fois que la protéine X des *Hepadnavirus* jouait un rôle essentiel dans la réplication virale.

Aujourd'hui l'implication de HBx dans la régulation de HBV n'est plus à démontrer.

En 2007, Keasler et al. [101] ont démontré *in vitro*, dans un modèle de cellules HepG2 que l'absence de HBx pouvait induire une réduction de 65% de la réplication de HBV et que la trans-complémentation du plasmide HBx-muté avec HBx sauvage permettait de restaurer cette réplication [101]. L'utilisation d'un modèle souris et de l'injection hydrodynamique des plasmides ont confirmé cette même observation *in vivo* [102]. Ces études ont démontré que la fraction nucléaire de HBx était indispensable à la régulation de la réplication du virus, suggérant un rôle au niveau de l'ADN viral.

En 2011, Lucifora et al. ont confirmé ces observations dans un modèle d'infection de PHH et de cellules HepaRG. L'utilisation d'inoculum HBV ou d'un inoculum HBV muté pour l'expression de la protéine HBx montre que l'absence de HBx conduit à la présence d'un ADNccc inactif. En effet, on retrouve dans les cellules infectées par ce virus muté la formation d'un ADNccc mais celui-ci n'est pas transcrit par la cellule. La complémentation de ces cellules avec un HBx exogène permet de rétablir la réplication du virus. Ces observations confirment que HBx est indispensable à la réplication du virus dans un modèle d'infection naturelle [76].

De façon intéressante le pool d'ADNccc intracellulaire n'est pas affecté par l'absence de HBx, seule la transcription de cet ADN est modifiée, conduisant à une diminution de la réplication de HBV, de la transcription et de l'expression des protéines virales [76].

De nombreuses équipes ont cherché à expliquer le rôle de HBx dans la réplication du virus et différentes fonctions ont été attribuées à HBx.

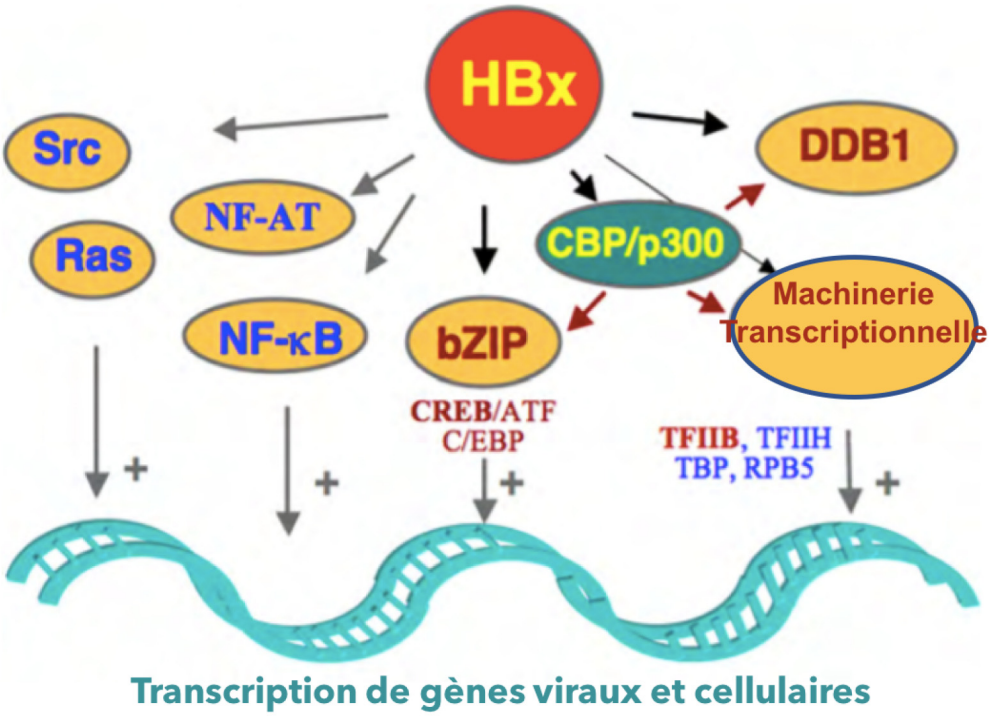


Figure 22 **Effet régulateur de HBx : une multitude de candidats.**

HBx semble activer la transcription via l'interaction directe ou indirecte avec des facteurs de transcription, des coactivateurs ou des composants de la machinerie transcriptionnelle. L'interaction de HBx avec les acétyltransférases CBP/p300 joue un rôle central dans l'activation de la transcription CREB dépendante. Figure adaptée de [106]

II.2.1. HBx permet la régulation de gènes indispensables à la réplication du virus

HBx a fait l'objet de pléthore de publications concernant son implication dans la régulation des gènes viraux et cellulaires et de son éventuel rôle de « transactivateur ». Cependant devant le nombre de modèles d'études différents, faire une synthèse exhaustive de la globalité des observations est compliqué. Je ne vous présente ici qu'un résumé sommaire des différentes fonctions de « transactivation » attribuées à HBx.

En 1987, pour la première fois, une équipe montre la capacité de HBx à activer la transcription des gènes viraux et cellulaires [103].
L'activité transactivatrice de HBx est faible mais en fonction du modèle d'étude semble capable d'activer un grand nombre de promoteur cellulaire et viraux [104]. De nombreux motifs ADN ont été identifiés comme la cible de HBx tels que les sites de liaisons de NF-kB, AP-1, C/EBP, CREB/ ATF, SP1, HIF-a, E2F, and NF-AT [105].

Deux mécanismes entreraient en jeu ; soit une interaction directe entre HBx et les récepteurs nucléaires de transcription, soit une activation des voies de signalisation de transduction.
HBx serait capable d'interagir directement avec différents composants de la machinerie transcriptionnelle, notamment TFIIB, et avec des facteurs de transcription comme les membres de la famille bZIP [107]. (FIGURE 22)

De plus, HBx est montrée pour activer la transcription de CREB/ATF. HBx est d'une part capable d'augmenter l'affinité entre CREB/ATF et l'ADN et d'autre part d'amplifier le recrutement de CBP/p300 sur les promoteurs cellulaires [108].
Les membres de la famille CREB/ATF sont impliqués dans la prolifération hépatocytaire, le métabolisme, la tumorigénèse, ce qui explique que leurs modulations par HBx représentent un aspect fondamental dans la pathologie.
On retrouve une séquence CRE (CREB-binding site-like sequence) au niveau de l'enhancer I et dans la séquence du PréS1, ceci pourrait expliquer l'effet de HBx sur la transactivation de l'ADNccc.

La réplication du virus est dépendante de deux mécanismes cellulaires importants que sont l'endocytose et l'autophagie, or ces processus sont favorisés par l'activation de la transcription engendrée par HBx puisqu'elle permet l'activation de gènes et de miRNA impliqués dans ces voies de signalisation, tels que les gènes de la famille RAB pour l'endocytose ou beclin-1 et miR-33a pour l'autophagie [94].
HBx semble impliquée dans la répression transcriptionnelle de certains miRNA (miR-138, miR-224, miR-596) connus pour bloquer la réplication de HBV en ciblant l'ARNpg [94].

L'expression de HBx semble corrélée avec une augmentation du calcium cytosolique dans les cellules.[109] En effet, HBx serait capable de déréguler les mitochondries en déstabilisant leur architecture et en induisant leur dépolarisation par son interaction avec VDAC3 (voltage-dependent anion channel 3) ce qui influence le taux de calcium cytosolique [109, 110].

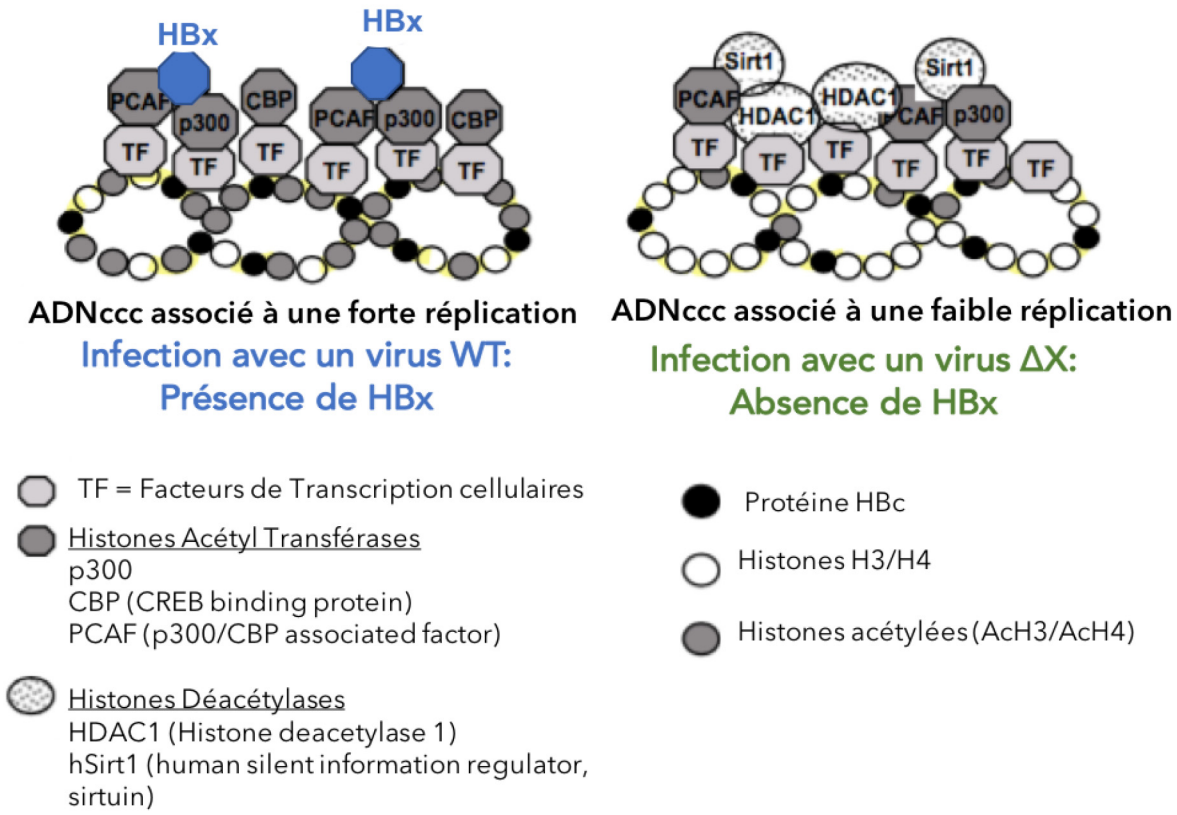


Figure 23 **Représentation de l'ADNccc, ses modifications épigénétiques et ses protéines associées en présence ou en absence de HBx**

Représentation des deux formes de l'ADNccc associées à une forte ou une faible réplication.
Figure adaptée de [52]

Ainsi HBx conduirait à la dérégulation des voies de la famille des Scr kinases en activant, par le biais de la régulation du calcium cytosolique, les FAK (focal adhesion kinase) et les Pyk2 (proline-rich tyrosine kinase)[111] [112]
L'importance de la signalisation du calcium pour la réplication du virus a été identifiée par l'équipe de Bouchard et al., cependant bien que la régulation du calcium par des agents exogènes puisse rétablir partiellement la réplication d'un virus déficient pour HBx, le mécanisme d'action n'est pas bien connu [113]. Il semblerait que le taux de calcium augmente l'encapsidation de l'ARNpg en favorisant la phosphorylation et l'assemblage des protéines core [114].

De plus, dans des modèles d'hépatocytes primaires de rats et des PHH, il a été montré que HBx induirait la progression du cycle cellulaire en permettant aux cellules quiescentes d'entrer en phase G1. Ce mécanisme, dépendant du calcium, est nécessaire à la réplication du virus [115, 116].

Toutes ces études peuvent nous laisser perplexe devant la multiplicité des cibles et des mécanismes d'actions de HBx, certainement dépendantes des modèles plus ou moins adéquats.

II.2.2. HBx régule l'ADNccc au niveau épigénétique

En 2009, Belloni et al. par des approches de ChIP démontre que HBx est recrutée sur l'ADNccc en parallèle de la réplication de HBV et du recrutement de facteurs de transcription tels que PCAF/GCN5 et les acétyltransférases p300 et CBP. L'utilisation de mutants de HBx modifie les marques épigénétiques sur l'ADN viral : moins d'acétylation des histones, moins de recrutements de p300 au profit du recrutement des histones desacétylases hSirt1 et HDAC1 [62]. HBx ne semble pas réguler seulement le statut d'acétylation des histones mais affecte également la méthylation et la phosphorylation de l'ADNccc [117] notamment par la sous-régulation de méthyltransférase DNMT3A à travers l'induction de miR-104 [118].

HBx régule donc la transcription de HBV en permettant la modulation de la chromatine de l'ADNccc. Il permet le recrutement de ses partenaires au niveau de l'ADNccc, comme CBP/p300 ou PCAF [108] [62]. De plus, HBx serait impliquée dans l'inhibition de facteurs cellulaires eux-mêmes impliqués dans la régulation de la transcription et de la chromatine tel que le complexe PP1/HDAC1 [119] ou la méthyltransférase PRMT1[120]. (**FIGURE 23**)

HBx interagit également avec le domaine Tudor de la protéine Spindlin1[121]. La Spindlin1 est impliquée dans la méiose et dans régulation de la transcription à travers la modulation des modifications post traductionnelles des histones. Elle interagit avec la triméthylation de la lysine K4 de l'histone H3 pour stimuler la transcription de l'ARN ribosomal. Ducroux et al. ont montré que la Spindlin1 pourrait induire une répression transcriptionnelle de HBV, mais aussi de HSV-1 (autre virus à ADN épisomal) par le biais de régulations épigénétiques. L'association entre HBx et la Spindlin1 permettrait de bloquer sa répression transcriptionnelle. On peut imaginer que HBx permettrait d'inhiber l'interaction entre l'ADNccc et la Spindlin1 [121].

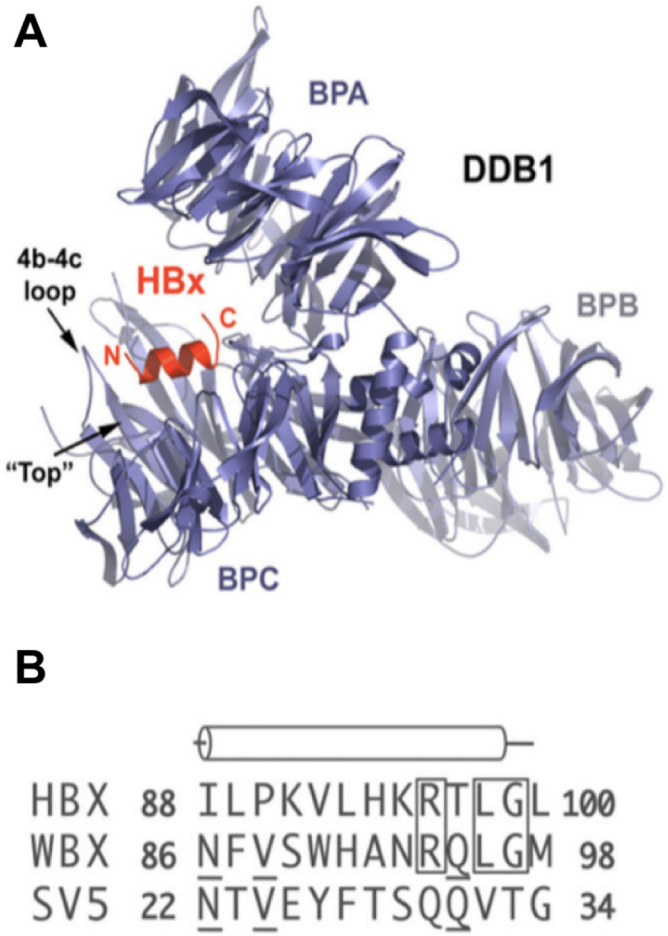


Figure 24 **Description de l'association entre HBx et DDB1**

(A) Modélisation de l'interaction entre HBx et DDB1 au niveau de la poche de DDB1 formée par BPA et BPC et de l'extrémité C- terminale
(B) Alignement des séquences de HBx, WHx et SV5, les 3 protéines sont capables d'interagir avec DDB1. Les acides aminés encadrés sont indispensables à l'interaction avec DDB1.
Figure adaptée de [98]

La plupart de ces publications reposent sur des modèles d'études de transfection de l'ADN viral, cependant il ne s'agit pas des modèles les plus pertinents car les conditions physiologiques, notamment la quantité d'ADN et de protéines virales, ne sont pas respectées. L'étude 1 de cette thèse apporte la confirmation dans un modèle d'étude plus physiologique du rôle de HBx dans la régulation de l'ADNccc au niveau épigénétique, par le biais d'une modulation de la compaction de l'ADN et des modifications épigénétiques notamment via le recrutement de SETDB1.

II.2.3. L'interaction avec DDB1 nécessaire à la réplication du virus

HBx est connue pour interagir avec un grand nombre de partenaires cellulaires, toutefois l'interaction la plus décrite est celle avec DDB1 (DNA Damage-Binding protein 1) [122]. Cette interaction est d'ailleurs conservée chez les marmottes et les écureuils.[123]. La protéine DDB1 est une protéine de 127kDa connue initialement pour son association avec DDB2 (DNA Damage-Binding protein 2) afin de former le complexe UV-DDB (UV-damaged DNA-binding protein) impliqué dans les mécanismes de réparation de l'ADN. Celui-ci est recruté au niveau des sites de dommages à l'ADN liés aux UV et permet le recrutement de la machinerie NER (nucleotide excision repair).
DDB1 est également connu pour être membre d'un complexe E3 ubiquitine ligase avec la Cullin-4A. Elle est de ce fait impliquée dans la régulation et l'ubiquitination de protéines. L'interaction entre HBx et DDB1 pourrait donc affecter les processus de réparation de l'ADN et perturber l'activité ubiquitine ligase du complexe DDB1-Cul-4 et ainsi influencer la stabilité des protéines cibles.

La nécessité de la liaison entre la protéine HBx et DDB1 pour la réplication du virus a tout d'abord été décrite chez les marmottes [124] (FIGURE 24) puis chez l'homme.

Cependant, cette interaction, indispensable à la réplication du virus dans les cellules *in vitro*,[125] affecterait également la viabilité des cellules [126, 127] .

Une approche cristallographique par rayons X a permis d'identifier que l'interaction entre HBx et DDB1 est spécifique d'un résidu au niveau de la région C-terminale de HBx et des poches BPC et BPA de DDB1 [98]. Ainsi la mutation R96E sur HBx inhibe totalement sa liaison avec DDB1 [128]. L'utilisation de ce mutant dans un modèle de HepG2 transfectées nous montre la nécessité de l'interaction HBx et DDB1 pour la réplication du virus [125]. (FIGURE 24)

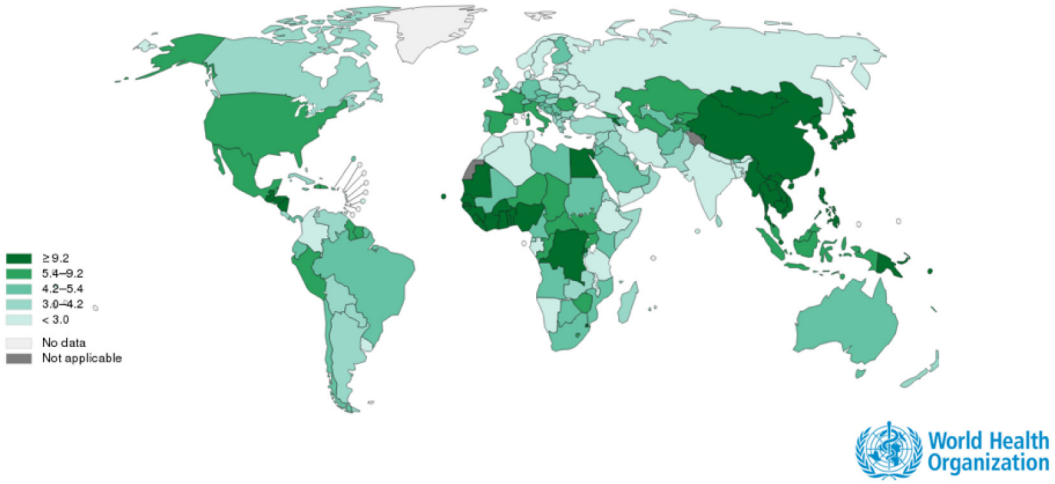
Les travaux précédents de l'équipe de M. Strubin et de O. Hantz ont montré que l'interaction entre HBx et DDB1 est indispensable à la réplication du virus HBV. En effet HBx, de par son interaction avec DDB1, permet la transcription de l'ADNccc. De façon intéressante, cette transcription est spécifique de la forme épisomale de l'ADN viral et ne concerne pas la forme intégrée. De plus, elle n'est pas limitée à HBV puisque toutes matrices d'ADN sous forme épisomales sont transactivées par la présence de HBx [77]. Les travaux de l'étude 2 de ce manuscrit confirment ce résultat et apportent une explication à ce phénomène.

II.3. Implication de HBx dans l'oncogenèse

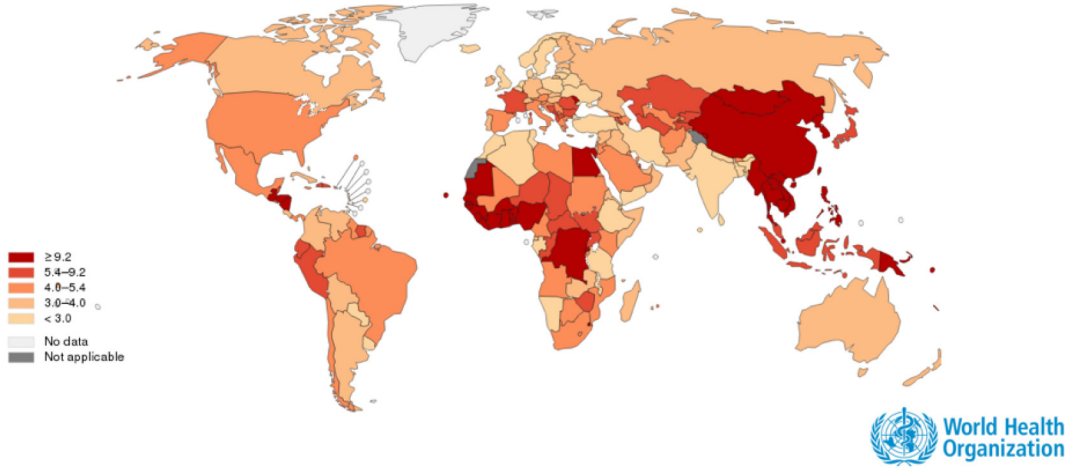
Parmi les multiples interactions entre HBx et des protéines de l'hôte, décrits dans la littérature, un grand nombre d'entre elles peuvent expliquer l'implication de HBx dans la dérégulation de processus cellulaires pouvant conduire à l'hépatocarcinogénèse. Mais aucune n'est assez convaincante pour permettre d'attribuer à HBx une activité oncogénique de HBx claire et directe. Cependant, la participation de HBx dans l'instabilité génétique et la dérégulation du cycle cellulaire tendent à montrer son implication dans l'oncogenèse viro-induite.

Ces mécanismes seront décrits ultérieurement dans le paragraphe IV.3.2 page 114.

Répartition mondiale de l'incidence du cancer du foie en 2012 (ajusté à l'âge)



Répartition mondiale de la mortalité du cancer du foie en 2012 (ajusté à l'âge)



© International Agency for Research on Cancer 2016

*F*igure 25 **Cartes des répartitions mondiales du taux d'incidence et de mortalité du cancer du foie.**

Les données sont estimées pour 100 000 individus, hommes et femmes confondus, tous âges confondus. Ces cartes ont été générées sur le site http://gco.iarc.fr/today du Centre International de Recherche sur le Cancer qui met à disposition des données du projet GLOBOCAN, 2012.
Cette répartition est différente en fonction du sexe, chez les hommes les régions de plus hautes incidences sont l'Europe du sud (9.5) et l'Amérique du Nord (9,3) et les régions les plus faibles sont l'Europe du Nord (4.6) et l'Asie du sud et Centrale (3.7). Pour les femmes ces taux sont généralement plus bas, les régions les plus concernées sont l'Asie de l'Est et l'Afrique de l'Ouest (respectivement 10.2 et 8.1), et les plus basses sont l'Europe du Nord (1.9) et la Micronésie (1.6).
Le pronostic du cancer du foie est faible en raison d'un ratio mortalité sur incidence de 0.95. C'est pourquoi les répartitions au niveau mondial sont si proches entre mortalité et incidence.

Partie 2 L'oncogénèse viro-induite

Plan

III. Cancer Hépatocellulaire (CHC) 78
III.1. Epidémiologie 80
III.2. Étiologie et facteurs de risques 80
III.2.1. La cirrhose 82
III.2.2. Les CHC d'origine virale 84
III.2.3. Les CHC d'origine toxique 86
III.2.4. Les CHC d'origine métabolique 88
III.3. Oncogenèse hépatique 92
III.4. Diagnostic, Suivi et Traitements 98
III.4.1. Dépistage 98
III.4.2. Diagnostic 98
III.4.3. Traitements à visée curative 100
III.4.4. Les traitements à visée palliative 102
III.4.5. Une nouvelle approche : La radiothérapie pour le traitement des CHC 104

IV. L'implication de HBV dans le CHC 108
IV.1. Intégration de l'ADN viral 110
IV.2. Instabilité génétique 110
IV.3. Rôle des protéines virales 112
IV.3.1. Les protéines de surfaces HBs et leurs mutations/délétions. 112
IV.3.2. La protéine HBx 114

III. Cancer Hépatocellulaire (CHC)

Le cancer du foie est de nos jours l'un des cancers digestifs les plus agressifs. Il existe deux types de cancers du foie que l'on distingue suivant leurs origines :

- **Les cancers dits primitifs,** appartiennent à deux catégories histologiques :

(i) les carcinomes hépatocellulaires (CHC). Le plus fréquent se développe aux dépends des hépatocytes dans un contexte d'hépatite chronique et de fibrose, à l'exception du carcinome fibrolamellaire qui survient sur un foie sain généralement chez les jeunes individus (seulement 0,5 à 1% des cancers du foie). Les principales causes sont l'infection chronique par les virus des hépatites B et C, la consommation d'alcool et la contamination par l'aflatoxine B1 dans certaines régions du monde.

(ii) les cholangiocarcinomes, bien moins fréquents, tirent leur origine dans les cellules épithéliales des canaux biliaires intrahépatiques et sont généralement liés à des cas de parasitoses hépatiques.

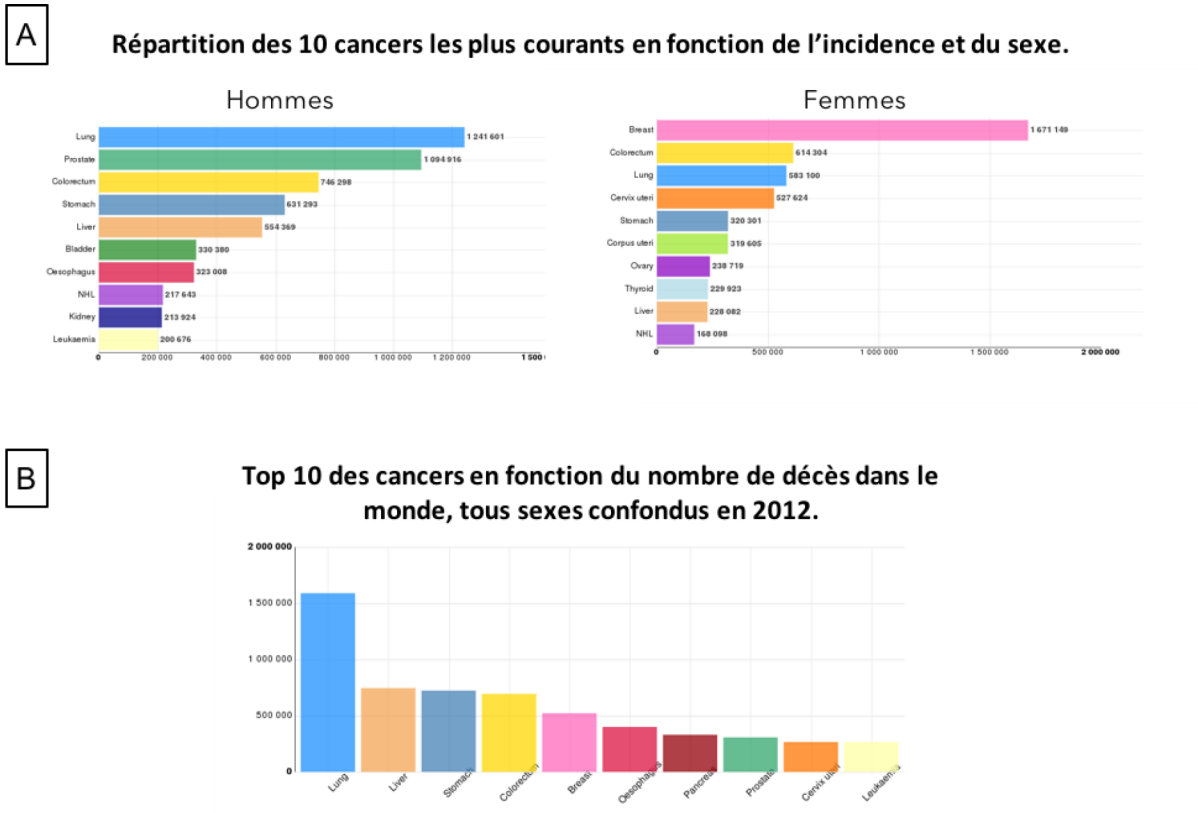


Figure 26 **Répartition des 10 cancers les plus courants**

A: Nombres de nouveaux cas de cancers dans le monde en fonction du sexe (hommes à droite et femmes à gauche)
B: Classement des cancers en fonction de leur mortalité dans le monde, tous sexes confondus.
Le cancer du foie est le 5ème cancer le plus courant chez les hommes (554,000 cas soit 7,5% du total) et le 9ème chez les femmes (228 00 cas soir 3,4%)
Il est la 2nd cause de décès par cancer dans le monde, on l'estime responsable de près de 746 000 décès en 2012 (9,1% du nombre de décès par cancer total)

- **Les cancers métastatiques** : ils sont beaucoup plus fréquents que les cancers primitifs et s'expliquent par la fonction filtre du foie. Lors de tumeurs métastatiques dans d'autres organes, les cellules cancéreuses peuvent se retrouver dans la circulation sanguine et lymphatique et être filtrées au niveau du foie pour former des métastases.

Au cours de cette thèse seuls les carcinomes hépatocellulaires seront étudiés.

III.1. Epidémiologie

La répartition des cancers du foie dans le monde montre des zones de très fortes endémies, notamment dans les pays en cours de développement, Asie du sud-est et Afrique subsaharienne. L'étude GLOBOCAN [129] de 2012 publiée par le Centre International de Recherche sur le Cancer montre que sur les 782 000 nouveaux cas de cancers du foie dans le monde, près de 83% sont détectés dans les pays les moins développés. (FIGURE 25)

Le cancer du foie est classé comme le 5ème cancer le plus commun en termes d'incidence chez les hommes et comme le 9ème chez les femmes. (FIGURE 26)

Néanmoins, l'évolution rapide et les difficultés diagnostiques et thérapeutiques conduisent à une très forte mortalité, classant le cancer du foie comme le second cancer en matière de décès. Il est responsable de près de 746 000 décès en 2012 soit 9,1% des décès par cancer (toutes régions et tous sexes confondus). Le pronostic de survie du cancer du foie est faible puisque le ratio mortalité sur incidence n'est que de 0.95 [130]. La moyenne mondiale de la survie observée à 5 ans n'est pas supérieure à 5% pour le CHC. La répartition mondiale de l'incidence est identique à celle de la mortalité.

III.2. Étiologie et facteurs de risques

La cause exacte responsable du cancer du foie reste inconnue mais plusieurs facteurs de risques ont été identifiés.
Un carcinome hépatocellulaire se développe dans 90% des cas sur un foie déjà cirrhotique. Cette pathologie se traduit par la synthèse de matrice extracellulaire par les cellules du foie et perturbe le fonctionnement normal de celui-ci.

Trois grandes causes peuvent expliquer l'apparition de la cirrhose et par conséquent la prédisposition au CHC: [131]
- des causes virales, due à l'infection chronique par les virus des hépatites B (HBV) et C (HCV), ou des coïnfections avec les virus du HIV (Virus de l'immunodéficience humain) ou HDV (Virus de l'hépatite delta).
- des causes toxiques dues à la consommation excessive et prolongée d'alcool, ou la consommation de denrées contaminées par l'aflatoxine B1 (AFB1).
- des causes métaboliques, chez les patients atteint de NASH (*non alcoolic steatose hepatic*) dont l'origine est une stéatose graisseuse souvent due au surpoids ou au diabète de type II, et des causes génétiques chez les patients souffrant d'hémochromatose.

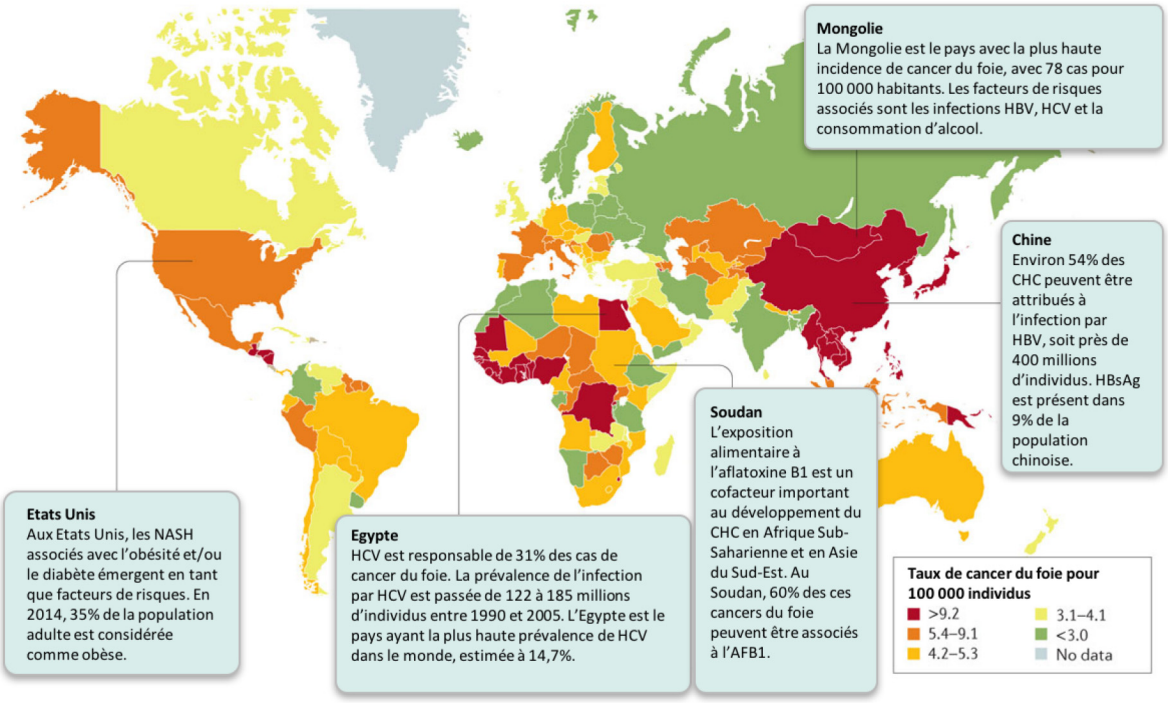


Figure 27 **Facteurs de risques associés au CHC en fonction des régions du monde.**

Ces étiologies ont une répartition différente selon les régions du monde. La prévalence du CHC est la plus haute dans les régions où l'infection par le HBV est endémique, c'est à dire en Asie de l'Est, Afrique Sub-saharienne ou Mélanésie, ce qui démontre l'importance majeure du HBV dans le CHC. Au Japon, Etats Unis et Europe, c'est l'infection par le HCV la cause principale des cas de CHC [132]. En France, les CHC d'origine HBV ne représentent que 10% des cas contre près de 50% dans le monde, montrant bien les variations existantes entre les différentes régions. (FIGURE 27)

HBV apparaît aussi comme un facteur aggravant lors de coinfections avec les virus HDV ou HCV qui sont principalement retrouvées en Afrique et en Amérique du sud ou en interaction avec l'aflatoxine B1 qui est retrouvée en Afrique subsaharienne.

La plupart de ces pathologies entraînent une cirrhose, première étape au développement du CHC. Quelques cas existent cependant de développement du cancer du au HBV sans passer par l'étape cirrhotique.

III.2.1. La cirrhose

La cirrhose du foie est la conséquence et l'évolution d'une fibrose tissulaire. La fibrose est généralement décrite comme la réponse adhérente et hors de contrôle à une blessure.

Les mécanismes de réparation de tissus sont des processus biologiques fondamentaux qui permettent le remplacement des cellules mortes ou défectueuses après une blessure. Ces dommages peuvent provenir de différents stimuli dont les infections virales, les réactions auto-immunitaires, les toxines, les radiations ou les blessures mécaniques.
La fibrose résulte d'une inflammation chronique, définie comme une réponse persistante sur plusieurs semaines ou mois au cours desquels se mélangent des processus d'inflammation, de remodelages de tissus et des mécanismes de réparations.
Ces dommages tissulaires persistants favorisent la production de facteurs de croissance, d'enzymes protéolytiques, de facteurs angiogéniques et de cytokines fibrogéniques qui stimulent la déposition d'éléments de tissus connectifs puis remodèlent et détruisent progressivement l'architecture tissulaire normale.

Le processus de réparation implique deux phases : (i) Une phase régénérative durant laquelle les cellules endommagées sont remplacées par des cellules du même type ; (ii) Une phase de fibrose durant laquelle les tissus connectifs remplacent le parenchyme tissulaire normal. Bien qu'initialement bénéfique, le processus de réparation devient pathogénique lorsqu'il n'est pas contrôlé, ce qui conduit au remodelage et la destruction de l'architecture normale du tissu. Dans certains cas et notamment pour les fibroses hépatiques un remodelage tissulaire étendu dû à la fibrose peut conduire à une insuffisance hépatique et au décès de l'individu [133, 134].

La cirrhose de toutes étiologies confondues prédispose à l'hépatocarcinome et peut même être considérée comme un état pré-cancéreux. On considère que la majorité des patients atteint de CHC dans le monde sont porteurs d'une cirrhose (80-90%) [135].

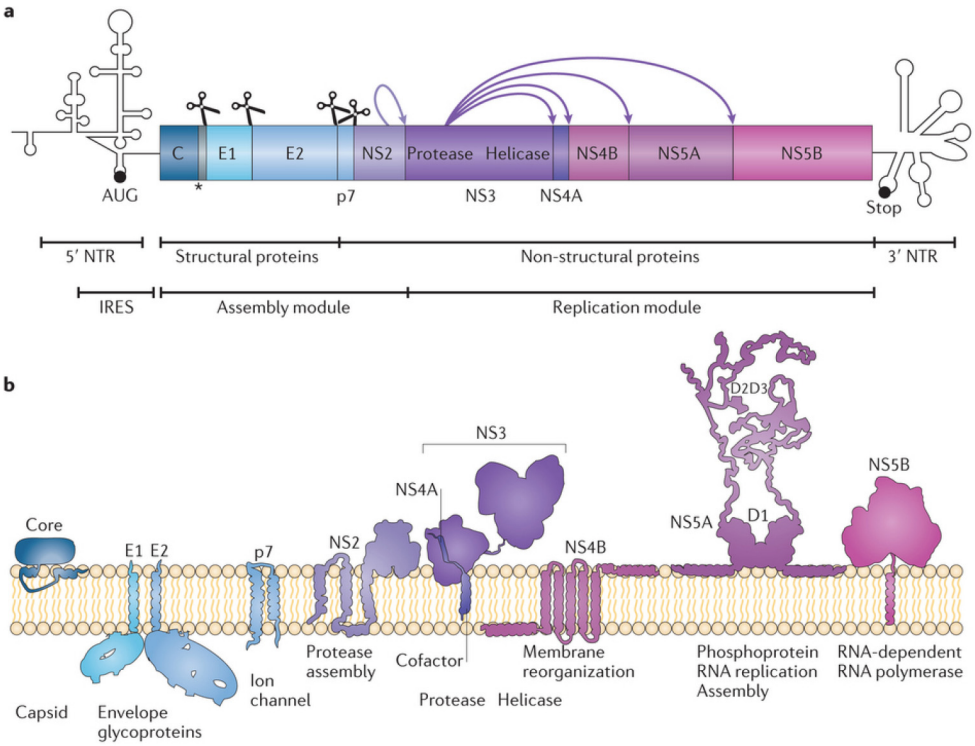


Figure 28 **Organisation du génome du HCV et topologie membranaire des protéines de HCV clivées.**

Figure tirée de [140]

A l'exception de certaines régions du monde où l'infection par le virus de l'hépatite B est endémique et où la prévalence d'autres facteurs de risque est très importante (par exemple l'aflatoxine B1), il est rare de trouver des CHC en l'absence de cirrhose [136].
Le papier de Fattovich et ses collaborateurs regroupe un grand nombre d'études et permet de montrer les étiologies les plus fréquentes pour des CHC avec cirrhose. L'infection par le virus de HCV est identifiée dans 27 à 73%, celle par le HBV dans 12 à 55% des cas, la prise d'alcool dans 4 à 38% et enfin les autres causes telles que l'hémochromatose dans 2 à 6% des cas. Pour les patients CHC sans cirrhose on retrouve 3 à 54% de patients HCV, 4 à 29% de patients HBV et 0 à 28% de consommateurs d'alcool [137].

III.2.2. Les CHC d'origine virale

III.2.2.a. Infection chronique par le virus de l'hépatite C

Le virus de l'hépatite C est le facteur de risque de CHC le plus important dans les pays d'Europe, d'Amérique du Nord et au Japon. En effet des études épidémiologiques ont montré la présence d'anticorps anti-HCV dans 70% des patients avec un CHC [138]. Dans la plupart des cas l'apparition du CHC est liée à la présence d'une cirrhose, cependant quelques cas ont été rapportés de CHC associé à HCV chez des patients non cirrhotique [139] indiquant le possible effet mutagène de ce virus [138].

Le virus de l'hépatite C est un virus enveloppé à ARN de la famille des *Flavivirus* au même titre que les virus de la dengue ou de la fièvre jaune. Il possède un génome de 9,6 kb avec un seul cadre de lecture (ORF) codant pour une grosse polyprotéine de 3 011 acides aminés. La polyprotéine est au cours des processus de traduction coupée par des protéases cellulaires et virales pour former les 3 protéines de structure (core, E1 et E2) et les 7 protéines non structurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS5A et NS5B). (FIGURE 28)

HCV infecte les hépatocytes humains et engendre des infections chroniques. La plupart des patients souffrant d'infection aiguë sont asymptomatiques. Les principales complications de l'infection chronique par le HCV sont la cirrhose et le cancer du foie expliquant la majorité des décès. [141]
Le risque annuel de développer un CHC chez les patients HCV dépend de la présence et de la sévérité des dommages engendrés au niveau du foie. Plus de 80% des infections HCV évoluent vers la chronicité, ces données varient en fonction du sexe et de l'âge des patients infectés [142]. L'inflammation chronique, la régénération des hépatocytes favorisent l'évolution vers la cirrhose pouvant induire le CHC [131].
Le principal mode de transmission de HCV est le contact avec du sang contaminé, certaines campagnes de vaccination ou de transfusion avec des seringues non stériles sont à l'origine des plus grandes épidémies du virus. Le risque de développer un CHC semble varier en fonction du taux de virus dans les produits contaminés et l'exposition répétée à ces sources de virus. Le lien entre protéines virales du HCV et le CHC n'est pas défini pour le moment, cependant la présence des protéines à n'importe quel niveau semble augmenter la prévalence au CHC car les traitements qui permettent l'élimination du virus diminuent le risque de

développer un CHC [143]. Les traitements du HCV permettent aujourd'hui l'éradication complète du virus et donc à long terme la disparition des CHC associés au HCV peut être espérée. Néanmoins actuellement le coût de ces traitements est extrêmement élevé et ne permet pas l'accès aux soins à tous.

III.2.2.b. Le virus de l'hépatite B

Environ 5 % de la population mondiale est infectée par le virus de l'hépatite B soit 350 à 400 millions de personnes. 75% de ces patients sont asiatiques et l'on retrouve une très faible proportion de porteurs HBV dans les pays de l'Ouest (Europe et Etat Unis). Il existe une très forte corrélation entre les régions à haute prévalence HBV et les zones où l'incidence et la mortalité due au CHC est élevée. L'infection chronique par HBV est le facteur de risque le plus important pour le CHC en Asie et en Afrique Subsaharienne à l'exception du Japon, où le risque majoritaire est le HCV [143].
Les campagnes de vaccination contre HBV démontrent le rôle de HBV dans la carcinogénèse. En effet, une étude à Taïwan suite à la campagne de vaccination dans les années 1980 montre une forte réduction des cas de CHC. Ceci a fait du CHC le premier cancer dont une partie de la prévention peut se faire par des programmes de vaccinations [144].

Les mécanismes du développement d'un CHC suite à l'infection chronique par le virus de l'hépatite B seront développés plus précisément dans les chapitres suivants.

III.2.3. Les CHC d'origine toxique

III.2.3.a. L'aflatoxine B1

L'aflatoxine B1 (AFB1) est une mycotoxine produite par les champignons de type *Aspergillus* très largement répandue dans certaines régions du monde telles que l'Asie et l'Afrique Subsaharienne. En raison des conditions climatiques (chaud et humide) et des conditions de stockage et conservation des denrées alimentaires, ces champignons contaminent une grande partie de la nourriture (blé, maïs, cacahuètes, légumes…) produisant une grande quantité de toxine.
L'AFB1 est aujourd'hui classée comme un puissant carcinogène : en effet, une fois ingérée, l'AFB1 est métabolisée en AFB1-exo-8,9-epoxide ayant la capacité de lier et d'endommager l'ADN. Cet intermédiaire induit essentiellement des transversions guanine (G) vers thymidine (T) [145] et conduit à une mutation sur la sérine 249 du suppresseur de tumeur p53 [146].
Cette mutation est détectée dans 30 à 60 % des échantillons de CHC collectés en zone endémique pour l'AFB1, cependant la plupart des patients étaient porteurs de l'HBV.[147]
Les zones d'exposition à l'AFB1 correspondent aux zones de très forte prévalence à l'infection par le virus de l'hépatite B. Ainsi bien que l'AFB1 puisse contribuer à l'hépatocarcinogénèse par d'autres mécanismes, son rôle dans la pathogénèse du CHC est principalement lié à ses effets sur l'infection chronique par le HBV. On peut citer en exemple une étude chinoise menée à Shanghai, qui a estimé que de la présence des métabolites de l'AFB1 dans les urines augmente de 4 fois le risque de développer un CHC, l'infection par HBV augmente ce risque

de 7 fois et la combinaison des deux facteurs de 60 fois [148]. Prévenir les CHC d'origine HBV par vaccination permettrait donc de réduire l'effet de l'aflatoxine B1 sur les CHC [143].

III.2.3.b. La consommation d'alcool

La consommation excessive d'alcool est définie par la prise de plus de 50-70g/jours sur une longue période. Le mécanisme par lequel l'alcool favorise le CHC n'est pas bien décrit. Cependant, des études chez l'homme et l'animal tendent à monter l'effet carcinogène de l'alcool [149]. Certains mécanismes pourraient expliquer cet effet comme la production d'acétyltaldéhyde et de radicaux libres au cours de la métabolisation de l'alcool, l'induction du cytochrome p450, l'altération de la régénération cellulaire et du système immunitaire.
Dans tous les cas, l'implication de l'alcool dans le développement de la cirrhose est bien connue et favorise donc le développement du CHC. Mais les mécanismes en jeu lors d'un CHC du à l'alcool en l'absence de cirrhose restent à définir [150].

III.2.4. Les CHC d'origine métabolique

III.2.4.a. Diabète sucré

Une étude américaine a montré que le diabète peut être une cause à part entière du CHC. Les patients diabétiques présentent un risque 2 à 3 fois plus élevé de développer un CHC. Dans une étude de 2005 aux Etats Unis, près de 60% des cas de CHC étudiés n'étaient pas d'origine virale, alcoolique ou d'autres causes connues. Parmi cette population, 47% des personnes étaient diabétiques. Le diabète représente donc une part non négligeable des facteurs de risque de CHC [151].
L'infection chronique par HCV est associée au diabète sucré ou à l'insulinorésistance par un effet direct sur le métabolisme du glucose. Le pronostic vital de ces patients est diminué en raison d'une élévation du taux de fibrose et de CHC et de la diminution de l'effet des thérapies type interféron [152].

Le diabète en tant que syndrome à une résistance à l'insuline est impliqué dans la survenue de la stéatose hépatique non alcoolique.

III.2.4.b. NASH

Un nouveau facteur de risque important pour le CHC apparaît depuis quelques années, en raison de la sédentarisation et des habitudes alimentaires, dans les pays développés : la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD Non alcoolique Fatty Liver Disease). On estime que 75-100 millions de personnes aux Etats Unis souffrent de cette pathologie or la plupart de ces patients ne sont pas diagnostiqués [153].
La stéatose hépatique non alcoolique se déclare chez les individus qui ne boivent pas ou peu

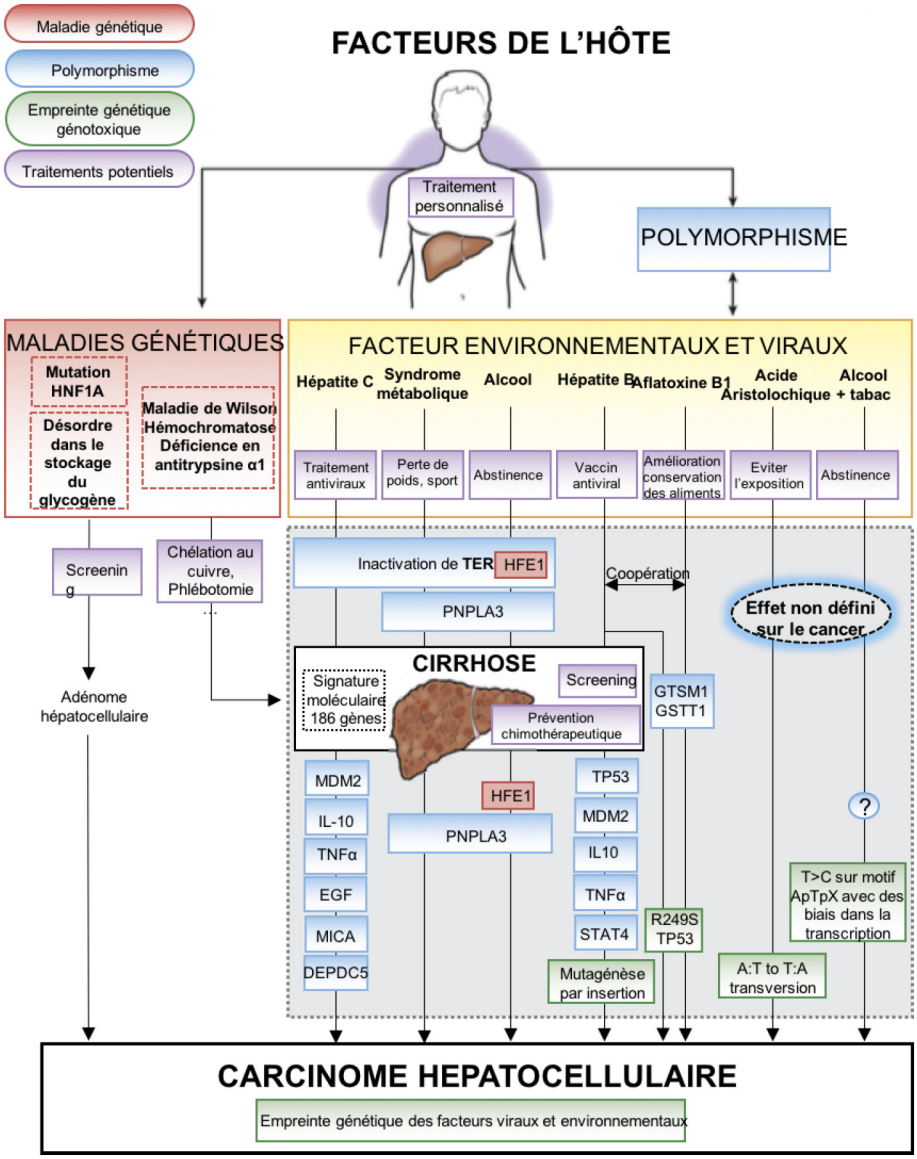


Figure 29 **Interaction entre prédisposition génétique, facteurs environnementaux et occurrence du CHC**

Les polymorphismes génétiques (en bleu) peuvent être impliqués dans la survenue ou la sévérité de la pathologie. Certaines pathologies génétiques (en rouge) prédisposent également au CHC. Figure adaptée de [157]

d'alcool mais qui développent une affection du foie. Elle peut être caractérisée comme une simple accumulation de graisses dans le foie, il s'agit alors d'une affection bégnine connue sous le nom de stéatose simple (NAFL, Non Alcoolic Fatty Liver) qui peut évoluer en NASH (Non Alcoolic Steatose Hepatic), ou stéatohépatite non alcoolique. La NASH est caractérisée par une inflammation qui d'un point de vue histologique n'est pas différente d'une stéatose alcoolique. Cette inflammation et la croissance tissulaire associée peuvent alors conduire à une cirrhose ou directement à l'hépatocarcinome [154].

Les facteurs favorisant le développement d'une stéatose hépatique non alcoolique sont le diabète de type II, la surcharge pondérale ou l'obésité ainsi que l'hyperlipidémie (taux élevé de lipides dans le sang). Il semblerait que les patients atteints du syndrome métabolique, ou la prise de certains médicaments comme les corticostéroïdes, les antirétroviraux ou ceux inhibant le système immunitaire présenteraient une plus forte susceptibilité à la stéatose hépatique non alcoolique.

La progression vers la cirrhose ou le CHC est retrouvée dans 2,5 % de patients avec NASH, ce qui est bien inférieur aux autres pathologies du foie, de même pour le temps nécessaire à l'évolution vers la cirrhose [155]. L'étude de Corey KE de 2017, montre que la susceptibilité à développer un CHC d'origine NASH est plus importante chez les hommes avec un âge élevé et qu'au contraire l'origine ethnique hispanique semble moins associée au développement du CHC [156]. Les caractéristiques biologiques et les taux de survie d'un CHC-NASH sont les mêmes que celles des CHC d'origine HCV, mais les patients sont diagnostiqués plus tard et surtout les CHC-NASH peuvent survenir en l'absence de cirrhose [154].

La conséquence majoritaire des NASH est donc due à son manque de diagnostic. En effet seul 20% des patients reçoivent une surveillance appropriée avant de développer le CHC. Cette absence de détection est problématique car lors du diagnostic les patients avec un CHC d'origine NASH ont atteint un stage avancé de CHC et présentent donc des taux de survie réduits. Les médecins recommandent donc une surveillance accrue non seulement des patients avec NASH mais aussi des populations à hauts facteurs de risques (diabète, obésité) [155, 156].

III.2.4.c. Autres facteurs

D'autres facteurs peuvent conduire au développement d'une cirrhose et ainsi prédisposer au CHC.

- La consommation de tabac, le tabac favoriserait l'émergence de CHC chez les patients cirrhotiques mais les mécanismes mis en jeu restent à découvrir.

- Certaines prédispositions génétiques peuvent conduire au développent de la cirrhose et/ou du CHC, on peut citer par exemple :

    - L'hémochromatose, une pathologie autosomique récessive qui se caractérise par une surcharge en fer dans l'organisme et à une accumulation dans le foie, qui peut conduire à des lésions anatomiques et fonctionnelles engendrant une cirrhose.

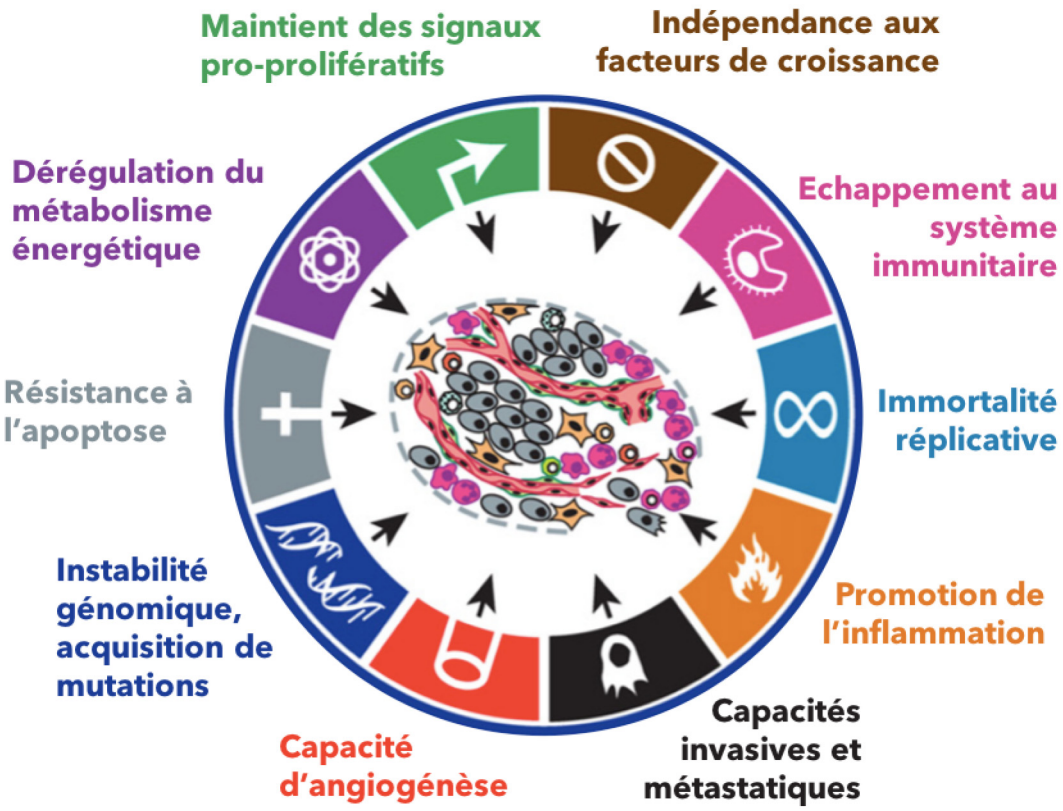


Figure 30 **Caractéristiques des cellules cancéreuses**.

Figure adaptée de [158]

- La déficience en alpha-1 antitrypsine est une maladie génétique qui se manifeste notamment par un emphysème pulmonaire et une cirrhose. Il s'agit d'une diminution du taux d'alpha 1-antitrypisine, l'inhibiteur des protéases le plus abondant dans le sérum humain.

Les polymorphismes génétiques peuvent réguler le risque de CHC à différents niveaux de la maladie. Ces polymorphismes peuvent être impliqués dans la prédisposition aux facteurs de risques (hépatites virales, consommation d'alcool ou obésité), dans la sévérité de la pathologie chronique et son évolution vers la cirrhose et enfin dans la transformation et la progression tumorale. La revue de J. Zucman-Rossi et al. synthétise les polymorphismes connus affectant les CHC [157]. (FIGURE 29)

III.3. Oncogenèse hépatique

Le foie est l'organe solide le plus volumineux du corps. Il remplit essentiellement des fonctions de détoxifications, des fonctions exocrines et endocrines et des fonctions de stockage.

Le foie est constitué de différents types cellulaires : 78% du foie est représenté par les hépatocytes mais on retrouve aussi des cholangiocytes, des cellules stellaires, des cellules biliaires et des cellules immunitaires (dont les cellules de Kupfer).
Les hépatocytes sont responsables de la métabolisation et de la transformation des substances entrantes par la veine porte, du stockage du glycogène et de la production de bile, d'albumine, de certains facteurs de coagulation et des protéines de la réaction inflammatoire aiguë. Les différents types cellulaires du foie peuvent être à l'origine du développement d'un cancer du foie mais le carcinome hépatocellulaire étudié dans ce manuscrit est issu des hépatocytes.

Une cellule cancéreuse est caractérisée par des propriétés de prolifération illimitée, d'une indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération, d'une résistance à l'apoptose accrue, d'une capacité à stimuler l'angiogenèse et à envahir le tissu avoisinant. C'est ce processus que l'on appelle la transformation cancéreuse [158]. (FIGURE 30)

Dans le cadre du CHC, ce processus est multifactoriel (HBV, HCV, alcool, AFB1, ...) et s'effectue en plusieurs étapes. De plus, comme nous l'avons vu précédemment le CHC a pour particularité de se développer principalement sur un terrain cirrhotique. Les données recueillies à partir des modèles animaux d'hépatocarcinogénèse et des cohortes de tissus cancéreux et précancéreux humains, ont permis de définir un certain nombre d'altérations impliquées dans le développement du CHC.

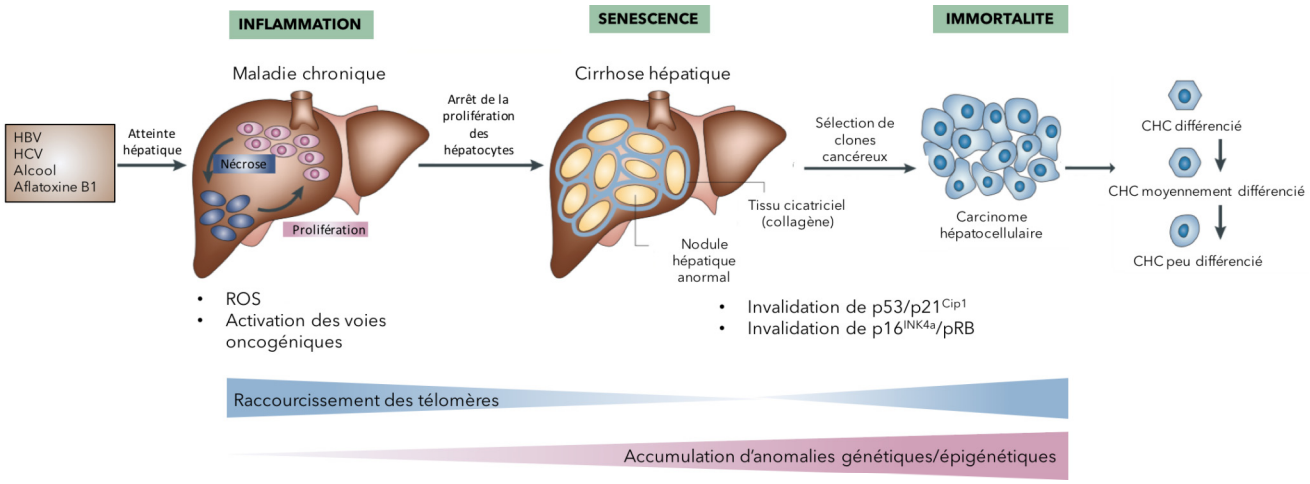


Figure 31 **Modèle histologique d'acquisition du phénotype cancéreux**

L'hépatite chronique engendre un stress oncogénique et/ou prolifératif en raison des cycles de nécroses et proliférations, qui mènent les hépatocytes à un état que l'on peut comparer à de la sénescence au sein des nodules cirrhotiques. Ce processus est accompagné d'un raccourcissement des télomères induisant une instabilité génomique. Des modifications génétiques/épigénétiques permettent à certains hépatocytes d'échapper à cet état, d'acquérir l'immortalité puis de se cancériser. Une réactivation de la télomérase au cours de cette progression restaure la stabilité génomique et confère une viabilité aux cellules cancéreuses. Selon la variété des anomalies génétiques/épigénétiques accumulées et probablement la nature des cellules hépatiques qui ont subi ce processus de transformation (hépatocytes matures, progéniteurs, cellules souches hépatiques), le CHC aura des caractéristiques histopathologies différentes.
Figure adaptée de [159, 160]

Le développement du CHC repose sur plusieurs phases [159, 161]: (FIGURE 31)

i) Tout d'abord l'hépatite chronique, associée aux infections virales ou autres facteurs de risques, est responsable de cycles de nécrose et prolifération hépatocytaire massive. Le foie a une capacité régénérative qui lui permet de maintenir son homéostasie. Ainsi, les hépatocytes peuvent engendrer une prolifération pour compenser le pool de cellules perdues. Les cellules détruites vont relarguer des cytokines qui vont, via la sécrétion d'IL-6 par les cellules de Kupfer, augmenter la prolifération et la survie des hépatocytes restants. Mais cette prolifération abondante conduit à :

   - Un raccourcissement des télomères [162]

   - Une accumulation de mutations liées aux erreurs de réparation et de duplication de l'ADN

   - Une perte d'hétérozygotie [160]
     - Délétions chromosomiques de régions impliquées dans l'apoptose et le contrôle du cycle cellulaire : 17p (p53) ; 8p ; 16q (E-Cadhérine) ; 16p (axine1) ; 4q (Cyclin A2) ; 9p (p16) ; 13q (pRb) ; 6q (IGFRII).
     - Amplification de régions impliquées dans la prolifération, ayant des propriétés oncogéniques : 1q, 6p, 7q, 8q (c-myc), 17q, 20q, 11q13 (cyclin D1), 6p21 (VEGFA).

   - Des altérations épigénétiques : méthylation de l'ADN, modification d'histones, dérégulation des miRNAs [163].

   - L'activation de voies oncogéniques : Wnt/β-catenin, Hedgehog, c-Met, IGF/IGFR2, Ras-Raf-MAPK, PI3K/AKT/mTOR, Myc, TGF-αJAK/STAT [159]. Les voies de l'apoptose sont également dérégulées [164].

ii) La capacité régénérative du foie finie par diminuer avec l'avancement de la maladie, et l'on voit apparaître des nodules cirrhotiques caractérisés par une sénescence réplicative des cellules [165]. La sénescence réplicative est un mécanisme biologique présent dans toutes les cellules normales qui vise à limiter le nombre de division cellulaire en activant la voie du DDR (« DNA Damage Repair »). A partir de là, des mécanismes permettraient d'outrepasser la sénescence de façon à laisser la cellule reprendre des cycles de division.
Les mécanismes qui participent à l'échappement de la sénescence réplicative ne sont pas tous connus, mais certains leviers sont identifiés comme :

   1/ la réactivation de le télomérase qui s'opère dans 90% des CHC et qui permet de restaurer la stabilité chromosomique nécessaire à la viabilité des cellules [160] [162].

   2/ l'inactivation des voies de p53/p21 et pRB /p16 [159, 161].

   3/ l'échappement des cellules en sénescence à la surveillance du système immunitaire [166].

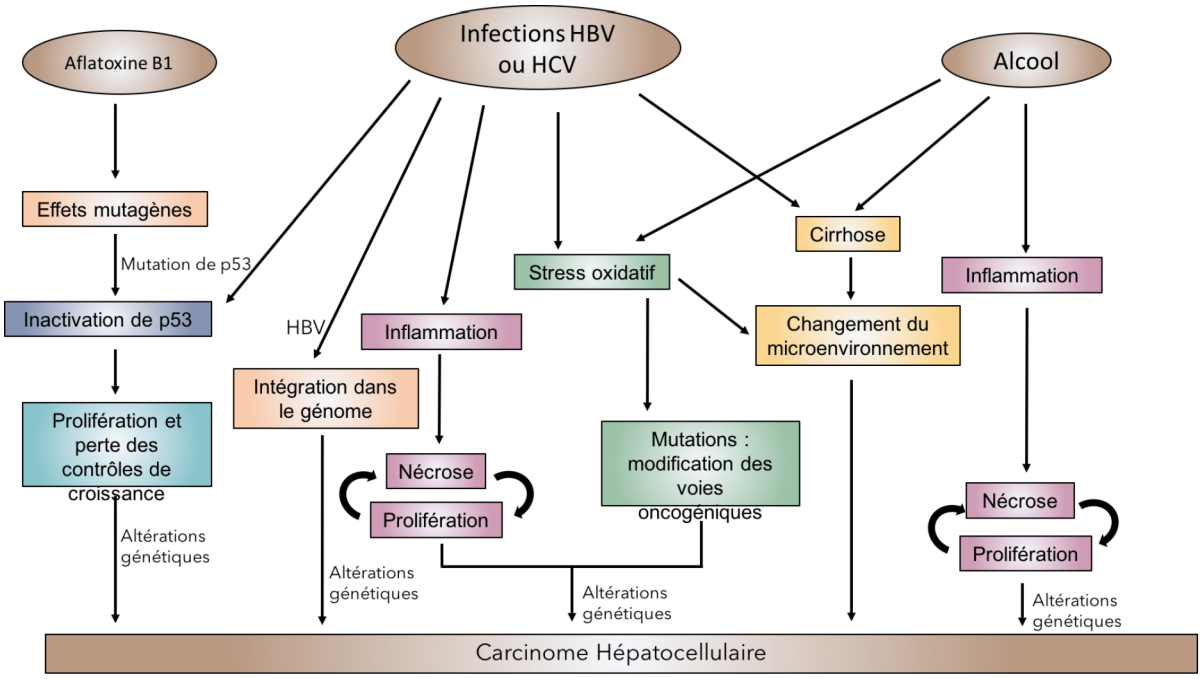


Figure 32 **Les facteurs de risques et mécanismes conduisant à l'hépatocarcinogénèse**

Les facteurs de risques de CHC sont responsables de nombreuses modifications biologiques au sein des cellules du foie et du microenvironnement. Des processus d'inflammation, de nécrose et régénération conduisent à l'émergence de cellules génétiques altérées et au développement du CHC.
Figure adaptée de [160]

iii) Les cellules pourraient alors accumuler les dernières anomalies moléculaires/génétiques/épigénétiques, dont celles précédemment citées, nécessaire à leurs transformations cancéreuses, en passant par une phase hyperplasique puis dysplasique pour finalement conduire au développement d'un carcinome hépatocellulaire.

Des évènements spécifiques aux facteurs étiologiques peuvent s'ajouter à ces mécanismes décrits et faciliter l'apparition de la cirrhose et donc du CHC. (FIGURE 32) Par exemple, l'intégration totale ou partielle du génome du HBV peut déréguler des gènes cellulaires et apporter des avantages de croissance [167]. La protéine virale HBx semble impliquée dans la transformation cellulaire en activant les voies des MAP kinases [168] ou en interagissant avec p53 [169, 170]. Les mécanismes reliant infection par HBV et hépatocarcinogénèse seront développés dans un chapitre spécifique.

Le HCV peut induire un stress du réticulum endoplasmique accompagné d'effets pro-carcinogènes. Les protéines virales de HCV montrent des effets pro-oncogéniques. C'est le cas de la protéine core qui est capable d'activer certains membres de la voie des MAP kinases et d'augmenter ainsi la prolifération cellulaire [171]. La protéine NS5A est capable d'interagir avec p53 et de la séquestrer à la membrane périnucléaire [172]. On peut aussi citer le rôle de HCV dans l'hépatocarcinogénèse via un stress oxydatif, en effet des études dans un modèle de souris transgéniques exprimant la protéine core montrent l'induction d'espèces réactives de l'oxygène et le développement de CHC [173]. Enfin, des souris transgéniques exprimant les protéines E1 et E2 et traitées par l'hépatocarcinogénèse diéthylnitrosamine (DEN), développent des CHC plus important que chez des souris exprimant la protéine core ou des souris non transgéniques [174].

En dehors des infections virales, un autre facteur de risque important associé au CHC est la consommation d'alcool qui semble provoquer la production de cytokines pro-inflammatoires conduisant à l'activation des cellules de Kupfer. De plus, l'exposition chronique à l'alcool sensibilise les hépatocytes aux effets cytotoxiques du TNFα (*tumor necrosis factor alpha*) et provoque un stress oxydatif qui alimente d'autant plus ces processus [175].

Le développement des technologies permettant l'analyse du profil d'expression du génome entier a permis l'analyse de cohortes de tumeurs afin de tenter de classifier les tumeurs en fonction des profils de mutations et éventuellement déterminer des biomarqueurs moléculaires pour orienter les patients vers un traitement plus adapté. En effet, il semblerait que malgré le stade clinique de la pathologie les tumeurs présentent de grandes différences d'un point de vue moléculaire. Or, la plupart des décisions concernant le traitement des patients sont prises en fonction du stade clinique des pathologies et ne prennent pas en considération les singularités moléculaires.
La classification des tumeurs basée sur les profils d'expression met en évidence deux classes majeures. Les tumeurs de la classe prolifératives sont caractérisées par un enrichissement en transcrits associés à une prolifération cellulaire et une progression dans le cycle cellulaire, ces tumeurs sont généralement associées à un phénotype plus agressif. Au contraire, les tumeurs de la classe non prolifératives présentent des profils proches de la physiologie des hépatocytes normaux [157].

III.4. Diagnostic, Suivi et Traitements

III.4.1. Dépistage

De nos jours le dépistage systémique des cas de CHC n'a lieu que dans 20% des cas. Or le dépistage est aujourd'hui un véritable enjeu de santé publique, en effet au moment du diagnostic seulement un quart des patients présentent une maladie au stade précoce, c'est à dire une pathologie pour laquelle il existe des traitements curatifs.
Les taux de prothrombine et d'albumine permettent de détecter d'éventuels dysfonctionnements au niveau du foie. Le dépistage du CHC repose sur la réalisation d'une échographie hépatique tous les 6 mois. Elle peut être complétée au besoin par une IRM.

Contrairement aux idées reçues, le dosage de l'alpha-foeto-protéine (AFP), hormone synthétisée par certaines tumeurs du foie, ne peut pas être utilisée dans un but de dépistage car les lésions de petites tailles ne synthétisent pas suffisamment d'AFP. Or ce sont principalement ces stades précoces qui sont visés par un dépistage systémique.
Aujourd'hui, la principale population ciblée par le dépistage systémique est le patient cirrhotique, mais les autres populations à risque comme les patients atteints d'hépatites B ou C chroniques et plus rarement pour le moment les patients touchés par les NASH sont également suivis pour des dépistages de CHC. Le dépistage systémique dans les populations à risque permet une réduction de 37% de la mortalité [176]. Ces données ont été confirmées par la suite par des études de cohortes de plus grande proportion [177].
L'état général du patient est également à prendre en compte lors du dépistage par exemple dans le cas d'une cirrhose trop avancée qui ne permettrait pas la réalisation d'un traitement pour le CHC.

III.4.2. Diagnostic

La biopsie hépatique est l'examen de référence pour le diagnostic du CHC. La biopsie de la tumeur est systématiquement associée à une biopsie du tissu non tumoral. Il est important d'analyser le tissu non tumoral, car en fonction du niveau de différentiation de la tumeur, le diagnostic peut être difficile. L'analyse histologique de ses tissus permet de poser le diagnostic de CHC et aussi d'identifier les éventuelles pathologies sous-jacentes pour déterminer l'étiologie de la tumeur, qui peut impacter sur le projet thérapeutique. En raison d'un taux important de faux négatifs il arrive que plusieurs biopsies soient nécessaires. Cependant dans certains cas, comme pour des lésions de plus de 2cm la biopsie peut ne pas être obligatoire [178].

La prise en charge du CHC nécessite l'évaluation de 3 paramètres : l'extension de la maladie, la sévérité de l'atteinte du foie sous-jacent et l'état général du patient. L'examen morphologique est réalisé par radiologie grâce au scanner ou à l'IRM.
Le second paramètre nécessaire à évaluer est le taux d'AFP et son évolution au cours du temps, celui-ci est un indicateur important du risque de récidive [179]. La sévérité de la cirrhose doit également être déterminée selon des classifications classiques telles que le score de Child-Pugh : pour cela les fonctions hépatiques et l'hypertension portale sont analysées. Le score de Child-Pugh permet d'évaluer la sévérité de la cirrhose, il prend en compte les symptômes tels

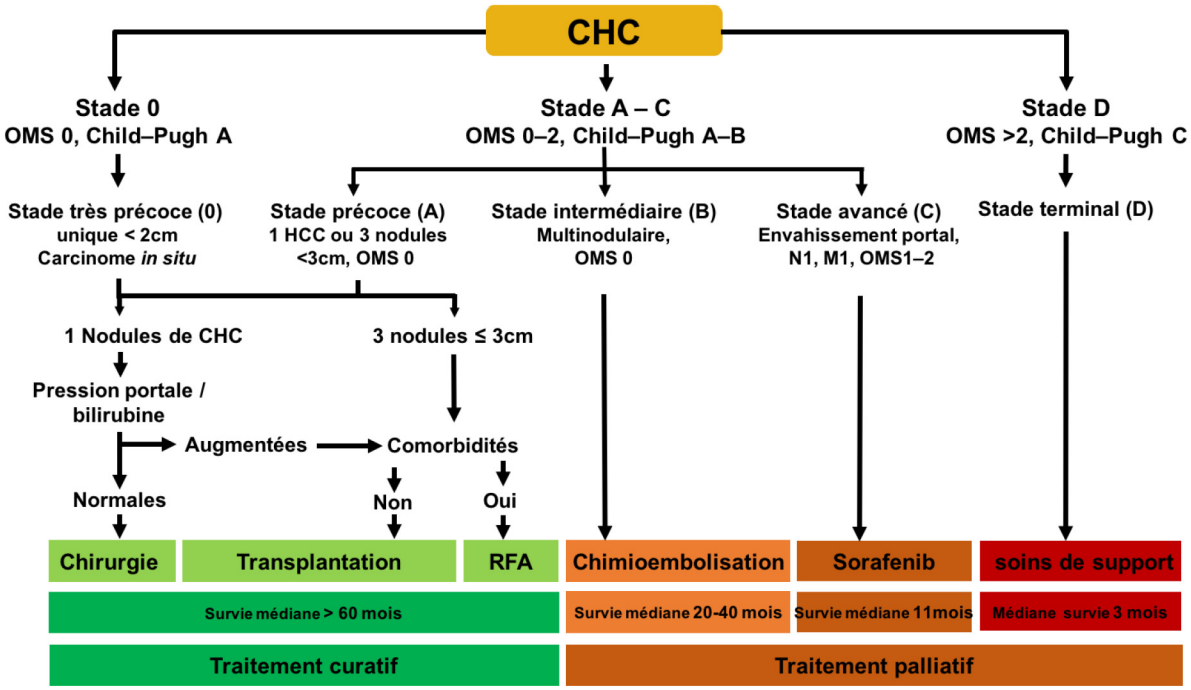


Figure 33 **Système de classification BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer) du carcinome hépatocellulaire et planification des traitements**

Ce système permet de classer les patients selon des variables associées au stade de la tumeur (taille et nombre), au statut fonctionnel du foie (score de Child-Pugh pour définir le stade de cirrhose), et à l'état général du patient (score OMS) et oriente vers une voie thérapeutique. Il existe 5 stades ; très précoce, précoce, intermédiaire, avancé ou terminal.
Figure adaptée de [180]

que l'encéphalopathie ou la présence d'ascite et les taux de bilirubine, albumine et prothrombine dans le sang. Ce score permet de grouper les cirrhoses en 3 classes (A, B, C). Une cirrhose compensée correspond à une classe A [178].
La classification BCLC (*Barcelona Clinic Liver Cancer),* qui constitue un algorithme de prise en charge plutôt qu'une véritable classification pronostique, est la plus utilisée et permet de définir le protocole médical à appliquer [180].

La classification BCLC (FIGURE 33) classe les CHC en 5 groupes : [177]

1/ Stade BCLC 0 : CHC très précoce non vascularisé qui présente une très faible probabilité de dissémination microscopique. Le traitement curatif préconisé est la résection chirurgicale du CHC localisé.

2/ Stade BCLC A : CHC qui présente 1 à 3 nodules cancéreux asymptomatiques. Les fonctions hépatiques sont encore normales. Les traitements envisagés sont la transplantation hépatique et les traitements percutanés.

3/ Stade BCLC B : CHC multi nodulaires sans invasion extra hépatique de la tumeur. Les fonctions hépatiques sont encore normales. Le traitement préconisé est la chimioembolisation transartérielle (TACE).

4/ Stade BCLC C : CHC avec une invasion extra-hépatique associé ou non avec des défaillances fonctionnelles du foie. Le seul traitement préconisé est le Sorafenib.

5/ Stade BCLC D : Patients qui présentent de très graves dysfonctionnements hépatiques et dont la survie n'excède pas trois mois. Il n'existe aucun traitement curatif.

Un grand nombre d'études ont été effectuées pour mettre en évidence les effets des différents types de traitements d'un point de vue survie des patients que ce soit pour les traitements à visée curative (ablations percutanées) ou à visée palliative (embolisation). La revue récente de Magistri et ses collaborateurs donne une vision de ses différentes études. [181]

III.4.3. Traitements à visée curative

III.4.3.a. La transplantation

La transplantation hépatique est le traitement curatif de choix puisqu'elle traite la tumeur et la maladie hépatique sous-jacente. Elle est le seul traitement à visée curative possible quand les fonctions hépatiques sont altérées. La publication des critères dits de Milan en 1996 a montré que les patients qui tiraient le meilleur bénéfice sont ceux qui présentent une lésion unique de moins de 5 cm ou 3 lésions dont la plus grosse mesure moins de 3 cm. Les patients qui remplissent ces critères ont une survie à long terme comparable à ceux transplantés pour une autre cause d'hépatopathie [182]. En effet, les études montrent qu'une tumeur inférieure à 5 cm de diamètre ou moins de 3 foyers de moins de 3 cm ne sont pas corrélées avec l'apparition des métastases. Or, la transplantation est impossible si la tumeur ne rentre pas dans ces critères car les potentielles métastases peuvent induire un cancer généralisé lors des traitements antirejets pour supporter le nouveau greffon.
Le taux d'AFP reflète le risque de récidive, ainsi cette mesure a permis l'élaboration d'un score. Un score supérieur à 2 définit les patients à haut risque de récidive, ces patients ont alors un accès limité à la transplantation.

La rareté des donneurs est le principal problème de la transplantation hépatique. Elle conduit à une augmentation des listes d'attentes et du temps entre la décision et la transplantation. Pendant ce temps, le CHC peut progresser et les patients ne plus être éligibles pour la transplantation, se pose alors la question d'un traitement d'attente défini et mis en place par les centres au cas par cas.

III.4.3.b. La résection chirurgicale

Si la tumeur est petite et localisée, le chirurgien peut procéder à une ablation partielle du foie. Il s'agit du traitement de référence en cas de CHC sur foie non cirrhotique.
On considère actuellement que le meilleur candidat à la résection est un patient qui présente un nodule unique de moins de 5 cm, avec une cirrhose compensée et sans hypertension portale. L'examen des fonctions hépatiques est important pour prévenir les risques de décompensation hépatique après l'hépatectomie. De plus, il est admis qu'en cas de cirrhose, le volume de foie restant doit être au moins de 40 % du volume total hépatique. En cas de volume hépatique restant insuffisant, il faut avant l'hépatectomie hypertrophier les lobes restant par une embolisation veineuse des parties qui seront réséquées.

III.4.3.c. Le traitement percutané

Une alternative intéressante à l'ablation partielle est la destruction tumorale percutanée. C'est le traitement de référence chez les patients de stade précoce (BCLC 0-A), c'est à dire pour des tumeurs de petites tailles (inférieure à 3cm), quel que soit le degré d'hypertension portale, car elle est moins invasive et engendre moins de complications. Ces thérapies sont basées sur la nécrose des cellules tumorales par l'injection de substances dans la tumeur (éthanol, acide acétique) ou des changements de températures (ablation par radiofréquence, microondes, laser, cryothérapie) [183]. Les plus utilisées sont l'injection percutanée d'éthanol (PEI) et l'ablation par radiofréquence (RFA). La RFA et la PEI montrent des résultats excellents pour les tumeurs ≤ 2 cm avec 90 à 100% de nécrose complète, mais pour de plus grandes tumeurs, la probabilité d'obtenir une nécrose complète est plus élevée avec la RFA. La radiofréquence permet un meilleur contrôle local et une meilleure survie globale. Elle repose sur l'utilisation d'un courant alternatif de 460 à 500 kHz qui chauffe le tissu à 50°C et entraine sa coagulation [183].
Cependant la localisation de la tumeur peut être une contre-indication importante si par exemple elle est proche des gros canaux biliaires, des gros vaisseaux, ou des organes creux. La radiofréquence unipolaire reste la plus répandue mais des approches de radiofréquence multipolaire (avec plusieurs sondes) sont en cours d'évaluation et permettraient de traiter des lésions jusqu'à 5 cm et parfois plus, avec des marges de sécurité acceptables [184].

III.4.4. Les traitements à visée palliative

Pour les patients diagnostiqués au niveau d'un stade B (intermédiaire) et C (avancé) selon la classification BCLC, seuls les traitements à visée palliative sont proposés.

III.4.4.a. La Chimioembolisation

La chimioembolisation transartérielle (TACE) repose sur la vascularisation principalement artérielle des lésions de CHC. Elle consiste en une injection d'un agent cytotoxique dans le débit artériel hépatique qui alimente la tumeur, suivi de l'arrêt de l'afflux sanguin afin d'augmenter le temps de présence des chimiothérapies dans les nodules cancéreux [185].

La chimiothérapie est suivie d'une embolisation artérielle avec des particules résorbables ou non résorbables [186]. Cette chimioembolisation est proposée chez les patients en bon état général, présentant des fonctions hépatiques conservées (Child A), avec de multiples nodules tumoraux mais sans envahissement vasculaire.
De nouvelles modalités utilisant des microsphères chargées (DC Beads) avec un agent cytotoxique sont en développement. La nécessité d'une nouvelle séance est évaluée après chaque séance par imagerie. Elle va permettre de freiner la progression de la tumeur et, ainsi, de prolonger la vie du patient.

III.4.4.b. Traitement médical

Le Sorafenib est actuellement le seul traitement ayant montré un bénéfice en termes de survie globale au stade avancé. Il s'agit d'une molécule aux propriétés anti-angiogéniques par inhibition des récepteurs du VEGF et du PDGF et antiprolifératives par inhibition de la voie des MAP kinases. Le Sorafenib est indiqué chez les patients avec de bonnes fonctions hépatiques mais avec une tumeur métastatique et/ou un envahissement vasculaire.
Un essai clinique de phase III ayant inclus plus de 600 patients (essai SHARP) a comparé le Sorafenib au placebo chez des malades atteints d'un CHC avancé. Celui-ci a mis en évidence un allongement significatif de la survie globale (médiane de 10,7 mois contre 7,9 mois) et de la survie sans progression (5,5 mois contre 2,8 mois) chez les malades traités par Sorafenib. Les effets indésirables sévères (de grade ≥3) observés chez les malades traités étaient principalement un syndrome mains-pieds (8-16%) et des diarrhées (8-9%).
Ces résultats ont été validés dans un autre essai de phase III effectué dans la zone Asie-Pacifique [187].
A ce jour, aucune autre drogue n'a prouvé un effet bénéfique sur la survie à long terme.

III.4.5. Une nouvelle approche : La radiothérapie pour le traitement des CHC

La radiothérapie est une approche nouvelle pour le cancer du foie, car les études précédentes pour le traitement d'autres cancers montraient clairement une très forte sensibilité du foie aux radiations. Les pathologies du foie induites par radiation surviennent lors de radiothérapies ciblées sur d'autres organes ou lors des protocoles d'irradiation du corps entier dans le cas de transplantation de moelle, et conduisent à des syndromes d'obstruction des petites veines hépatiques, des hépatomégalies, ou à la production d'ascite et peuvent avoir des conséquences fatales [188].

La tolérance maximale du foie est de 28 à 35 Gy mais ces doses ne sont pas suffisantes pour éradiquer les cellules cancéreuses [189]. De nouvelles approches permettant de traiter les tumeurs avec des doses plus fortes et de façon plus précise ont donc été développées.

III.4.5.a. La radiothérapie externe

Les radiothérapies externes conventionnelles ne permettaient pas de cibler un volume limité de la tumeur et ne prenaient pas en compte les mouvements du corps, tel que la respiration. En plus de provoquer une toxicité au niveau de foie, les conséquences des radiations pouvaient se ressentir sur les organes adjacents tels que l'estomac, le duodénum ou les reins. Les nouvelles technologies ont permis le développement de radiothérapies tridimensionnelles conformationnelles de haute dose (3D-CRT). Cette approche permet de délivrer précisément une forte dose au niveau de la tumeur tout en épargnant au maximum les tissus et organes adjacents [190].

La radiothérapie de conformation tridimensionnelle (3D-CRT) utilise un nombre variable de faisceaux de radiation et une mise en forme de chaque faisceau convenant au profil de la cible en prenant en compte les mouvements du corps. En effet, la respiration peut engendrer des déplacements jusqu'à 3 cm de la tumeur.

Dans une étude de phase II réalisée par Mornex et al., 25 patients cirrhotiques ne pouvant pas bénéficier de traitements curatifs ont été traités par 3D-CRT par fractions de 2 Gy pour une dose totale de 66 Gy. Cette étude a monté des résultats prometteurs, 92% des patients ont présenté une réponse au traitement partielle (12%) ou totale (80%), et une bonne tolérance [191].

La radiothérapie avec modulation d'intensité (IMRT) est une amélioration de la 3D-CRT. Utilisant des profils d'intensité de faisceaux non uniformes avec une optimisation assistée par ordinateur, elle permet une distribution de la dose supérieure. Comme l'intensité des rayons individuels au sein de chaque faisceau est modifiée, l'IMRT permet un meilleur contrôle de la distribution de la dose améliorant ainsi la capacité d'adapter le volume de traitement aux formes concaves des tumeurs [189].

Devant la récurrence de certaines tumeurs qui proviennent généralement de régions en dehors de la zone irradiée, de nouveaux protocoles se développent visant à combiner la radiothérapie avec des approches de chimioembolisation ou TACE. Les premières études semblent montrées un effet bénéfique de cette approche. Une étude française TACERTE comparant l'association radiothérapie + chimioembolisation à la chimioembolisation seule est en cours et permettra de répondre quant au bénéfice de cette approche [190].

D'autres études visent également à utiliser un autre type de radiation externe, l'utilisation de particules chargées comme les protons, et particules α ou encore les particules lourdes (ions carbones, néon, silicon, argon). Les caractéristiques physiques de ces rayonnements permettent un ciblage très précis de la tumeur et de délivrer une très forte dose en profondeur en épargnant les tissus sains [189].

De façon à potentialiser les effets de la radiothérapie, notre équipe a démontré dans une preuve de concept que l'utilisation d'inhibiteurs des voies de réparation, notamment les inhibiteurs de PARP, pouvaient être utilisés pour améliorer la mort des cellules cancéreuses *in vitro*. Cette approche est étudiée dans le 3ème projet de ce manuscrit [192].

Tableau 5 **Facteurs favorisant le CHC chez les patients HBV**

Facteurs viraux	Haute virémie persistante
	HBeAg positif
	Génotype HBV (C ou B)
	Variants HBV : mutations BCP ou régions PréS
Facteurs de l'hôte	Genre masculin
	Age élevé
	Cirrhose
	L'âge au moment de l'infection
	Polymorphismes génétiques au niveau des cytokines et des enzymes de détoxification
	Diabète, Obésité
Facteurs environnementaux	Exposition à l'AFB1
	Consommation d'alcool
	Conditions nutritionnelles (excès de fer, famine)

Adapté de [196]

III.4.5.b. La radioembolisation ou radiothérapie interne

Elle consiste en l'injection intra-artérielle hépatique de microsphères chargées à l'Yttrium-90, source de rayonnement bêta, permettant de réaliser une radiothérapie interne de la lésion. Les principales études dans le CHC concernent le stade intermédiaire ou avancé. Une étude a comparé des patients traités par radioembolisation contre des patients traités par chimioembolisation conventionnelle. La radioembolisation allongeait de manière significative le temps de la progression par rapport à la chimioembolisation classique (13,3 mois contre 8,4 mois) avec un taux de complications moindre notamment l'absence de syndrome post-embolisation. Néanmoins, la survie globale n'était pas significativement augmentée [193].
Il existe actuellement des études contrôlées en cours comparant le radioembolisation au Sorafenib et l'association radioembolisation-Sorafenib au Sorafenib seul.

La radiothérapie comme option thérapeutique pour le carcinome hépatocellulaire promet de nouvelles avancées dans la prise en charge de ce cancer [194].

IV. L'implication de HBV dans le CHC

Nous l'avons vu précédemment, l'infection chronique par HBV représente près de 50% des CHC dans le monde. Le pourcentage de CHC attribué au HBV reflète la distribution de l'infection par HBV dans le monde et varie en fonction des zones géographiques.

Chez les patients HBV le risque de développer un CHC est 10 à 25 fois plus élevé que dans la population non infectée. Il est important de noter que toutes phases de la pathologie chronique n'évoluent pas en CHC de la même manière. En effet, les patients en phase d'hépatite active ont plus de risque de développer un CHC. De plus, la progression vers le CHC est déterminée en fonction de facteurs liés à l'hôte tel que l'âge au moment de l'infection, le genre ou certains facteurs génétiques. Il semblerait qu'il existe certaines prédispositions génétiques puisque l'on retrouve des polymorphismes spécifiques et communs dans de nombreux CHC d'origine HBV [157]. (**TABLEAU 5**)

D'autres facteurs reliés au virus entrent aussi en jeu, tels que la co-infection avec d'autres virus (HDV, HCV ou HIV), la charge virale, le génotype ou les variants. On peut citer pour exemple les variants de HBV présentant une mutation dans la région BCP (Basal Core Promotor), cette mutation conduit à une réplication virale plus importante et donc une charge virale supérieure et favorise la survenue de CHC [195]. De plus, les facteurs de comorbidités sont nombreux ; la consommation d'alcool, le tabac, l'exposition à l'AFB1 vont favoriser la survenue du CHC.

Les mécanismes de carcinogénèse suite à une infection par le virus de HBV ont été énormément étudiés, il en ressort que le principal facteur au développement du CHC est le haut titre viral et l'inflammation chronique qui conduit à la fibrose et à la prolifération adhérente des hépatocytes.
Cependant, un tiers des patients atteint de HBV vont développer un CHC sans passer par la phase cirrhose alors que pour les autres facteurs de risques attribués au CHC près de 80% auront un terrain cirrhotique [137], suggérant une conséquence directe du virus HBV sur l'hépatocarcinogénèse.

HBV participe à l'hépatocarcinogénèse par différents mécanismes :

1) Rôle indirect de HBV s'étalant sur 10 à 30 ans : l'infection chronique induit une réponse immune/inflammatoire responsable de cycles de nécrose/prolifération au sein du tissu infecté pouvant conduire à la fibrose, à la cirrhose puis au CHC.
2) Un rôle plus direct faisant intervenir notamment les protéines virales
    a. Profitant de sa capacité rétrovirale, il est capable de s'intégrer dans le génome cellulaire et conduit à la dérégulation de gènes aux capacités oncogéniques.
    b. Il contribue à l'instabilité du génome par son intégration, mais aussi par l'activité des protéines virales
    c. Les protéines virales sauvages ou mutées (HBx, HBc et préS) affectent les fonctions cellulaires, activent des voies oncogéniques et sensibilisent les cellules aux agents mutagènes.

IV.1. Intégration de l'ADN viral

L'intégration du génome viral dans celui de l'hôte est un phénomène précoce au cours de l'infection et est retrouvée dans 85 à 90% des CHC associés au HBV. Contrairement au modèle d'étude du WHV dont le génome viral s'insère dans un site préférentiel au niveau de c-Myc ou N-Myc, il n'est pas clairement défini si l'intégration de HBV dans le génome humain est aléatoire ou non [197].
Cette intégration de tout ou d'une partie du génome ne contribue pas à la réplication de HBV mais est la cause d'une forte instabilité génomique qui a pour conséquence la modulation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'hépatocarcinogénèse.

On peut citer pour exemple, les évènements d'intégration dans des gènes cellulaires qui peuvent apporter un avantage de croissance à un clone spécifique et donc engendrer une accumulation de mutations.
Parmi les gènes dérégulés par l'intégration les plus courants sont : le gène hTERT (telomerase reverse transcriptase) codant pour la sous-unité catalytique de la télomérase, PDGFβ et PDGFRβ (platelet-derived- growth-factor (receptor)-β), MAPK1 (mitogen activated protein kinase 1) [167], MLL4 (mixed-lineage leukaemia protein 4), CCNE1 (cycline 1), SENP5 (Sentrin-specific protease 5) ou ROCK1 (Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1)

Dans environ 40% des cas, l'insert de HBV est situé entre l'enhancer viral et les ORF des gènes X ou C. Ainsi cette intégration peut conduire à l'expression de protéines virales dans les hépatocytes telles que la protéine préS/S tronquée ou non et surtout des formes mutées ou tronquées de HBx qui vont déstabiliser de nombreuses voies cellulaires.

IV.2. Instabilité génétique

L'instabilité génétique retrouvée dans les CHC associés au HBV est due à la fois à l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire et à l'activité de certaines protéines virales.

Tout d'abord, l'intégration de séquences de HBV forme des « hot spots » pour les recombinaisons génomiques ce qui peut conduire à des délétions de chromosomes ou à des transpositions.

La protéine HBx induit une instabilité génétique notamment en affectant les processus mitotiques, en inactivant p53 et de par son interaction avec le DDB1. Comme développé précédemment la liaison entre HBx et DDB1 est forte et est nécessaire à la régulation du virus HBV. Cependant cette liaison affecte également la viabilité cellulaire [126, 127] par la promotion de l'apoptose. Ce mécanisme est conservé entre les espèces car un effet cytotoxique de l'association entre DDB1 et WHx est observé [123].
Cette interaction peut également expliquer la transformation cellulaire. En 2008, Martin-Lluesma et al. [198] ont démontré que HBx, via sa liaison avec DDB1, pouvait affecter la progression du cycle cellulaire en phase S conduisant à des fourches mitotiques adhérentes et à l'apparition de cellules multi nucléées et ainsi induire une instabilité génétique [198]. Cette instabilité génétique est un premier pas vers le développement du CHC.

D'autres études suggèrent un rôle de HBx dans la dynamique des centrosomes et la formation des fourches mitotiques de par sa liaison avec HBXIP, un régulateur important de la duplication des centrosomes [199] conduisant à une instabilité génétique due à une mauvaise ségrégation des chromosomes.

Enfin, préS2 est impliquée dans le clivage de la cycline A et conduit, chez les souris transgéniques à la duplication des centrosomes et donc à l'instabilité des chromosomes [94].

IV.3. Rôle des protéines virales

Les protéines virales jouent un rôle important dans l'hépatocarcinogénèse induite par HBV car elles peuvent affecter la viabilité cellulaire, la prolifération et sensibiliser les cellules aux mutagènes exogènes.

IV.3.1. Les protéines de surfaces HBs et leurs mutations/délétions.

Le potentiel oncogénique des protéines de surface de HBV a été suggéré par des expériences qui ont montré leurs rôles dans la prolifération cellulaire. Ainsi la forme tronquée de L-HBs induirait l'expression de la cycline A, et M-HBs pourrait activer les voies c-Raf-1/Erk2 [200].
Les protéines preS2/S présenteraient des propriétés transactivatrices. Elles vont contribuer à la prolifération et à la survie cellulaire en surexprimant la Cycline A, c-myc, c-fos. De plus, ces protéines de surface de HBV ont la capacité d'activer différentes voies oncogéniques comme ERK/MAPK et AKT/mTOR [201].

Les mécanismes de sélection dus aux thérapies ainsi que l'évolution naturelle ont conduit à l'émergence de variants de HBV notamment au niveau des régions préS/S. Ces mutants sont souvent retrouvés chez les patients infectés chroniquement et peuvent affecter la pathogénicité de l'infection [202].

En plus d'affecter les propriétés antigéniques des virions, les mutations de séquences préS/S peuvent avoir d'autres conséquences.

Certains variants spécifiques de HBs s'accumulent lors d'une infection chronique au nouveau du réticulum endoplasmique et induisent donc un stress du réticulum qui conduit, à long terme, et lorsque les mécanismes du réticulum sont surchargés, à une accumulation de ROS et donc à un stress oxydatif [203]. Ce stress provoque des dommages à l'ADN et conduit à une instabilité génétique.

En parallèle, l'infection chronique par HBV conduit à une inflammation chronique qui engendre également un stress oxydatif. L'induction des ROS active les cellules étoilées du foie, ces cellules fibrogéniques participent à la production de la matrice extracellulaire lors de la fibrose permettant une augmentation de la prolifération des hépatocytes [201].

Une méta-analyse de 2009 a mis en évidence qu'une infection par un virus avec une mutation en préS était associée avec un risque plus élevé de 3,77% de développer un CHC [204]. Aujourd'hui le fait que certaines mutations de préS jouent un rôle dans la carcinogénèse est bien accepté.

L'accumulation de protéines mutées et le stress du réticulum associé ont une signature histologique précise avec la présence d'hépatocytes en verres dépolis (GGH – ground glass hepatocytes) considérés comme un marqueur de l'infection chronique et reconnus comme une lésion précurseur du CHC.

Le stress du réticulum engendré par les protéines HBs mutées est responsable d'une accumulation de dérégulation dans les cellules qui peut conduire à l'instabilité du génome et au développement du CHC [202].

IV.3.2. La protéine HBx

Les premières suspicions de l'implication de HBx dans l'oncogenèse reposent sur le fait que seuls les *Hepadnavirus* de mammifères codent pour une protéine HBx et ce sont les seuls à conduire au développement de cancer du foie chez leurs hôtes. En effet, les *avihepadnavirus* ne codent pas pour une protéine HBx bien individualisée [205].

Les premières preuves d'un effet de HBx sur la survenue du CHC étaient des preuves indirectes. Il est possible de détecter des séquences d'ADN viral intégrées dans près de 85 à 90% des cas de CHC d'origine HBV. Ces intégrations sont souvent incomplètes et peuvent être réarrangées mais la séquence du gène X est très souvent maintenue. Il apparaît préférentiellement une délétion de la région C-terminale de HBx lors de l'intégration dans le génome cellulaire [206]. Plusieurs études ont démontré la présence de l'ARN de HBx et de la protéine dans des tumeurs humaines même en l'absence de réplication du virus [207, 208]. L'intégration de l'ADN viral peut être à l'origine d'une instabilité génétique favorisant la transformation cellulaire. De plus, l'expression des protéines virales et notamment HBx et ses différents mutants peuvent moduler différents aspects du cycle cellulaire et induire l'hépatocarcinogénèse [97].

Le rôle direct de HBx sur la tumorigénèse a longtemps été étudié mais les résultats restent controversés. Les différents modèles cellulaires se contredisent et les résultats sur des modèles de souris transgéniques sont divergents en fonction du fond génétique des souris [97].

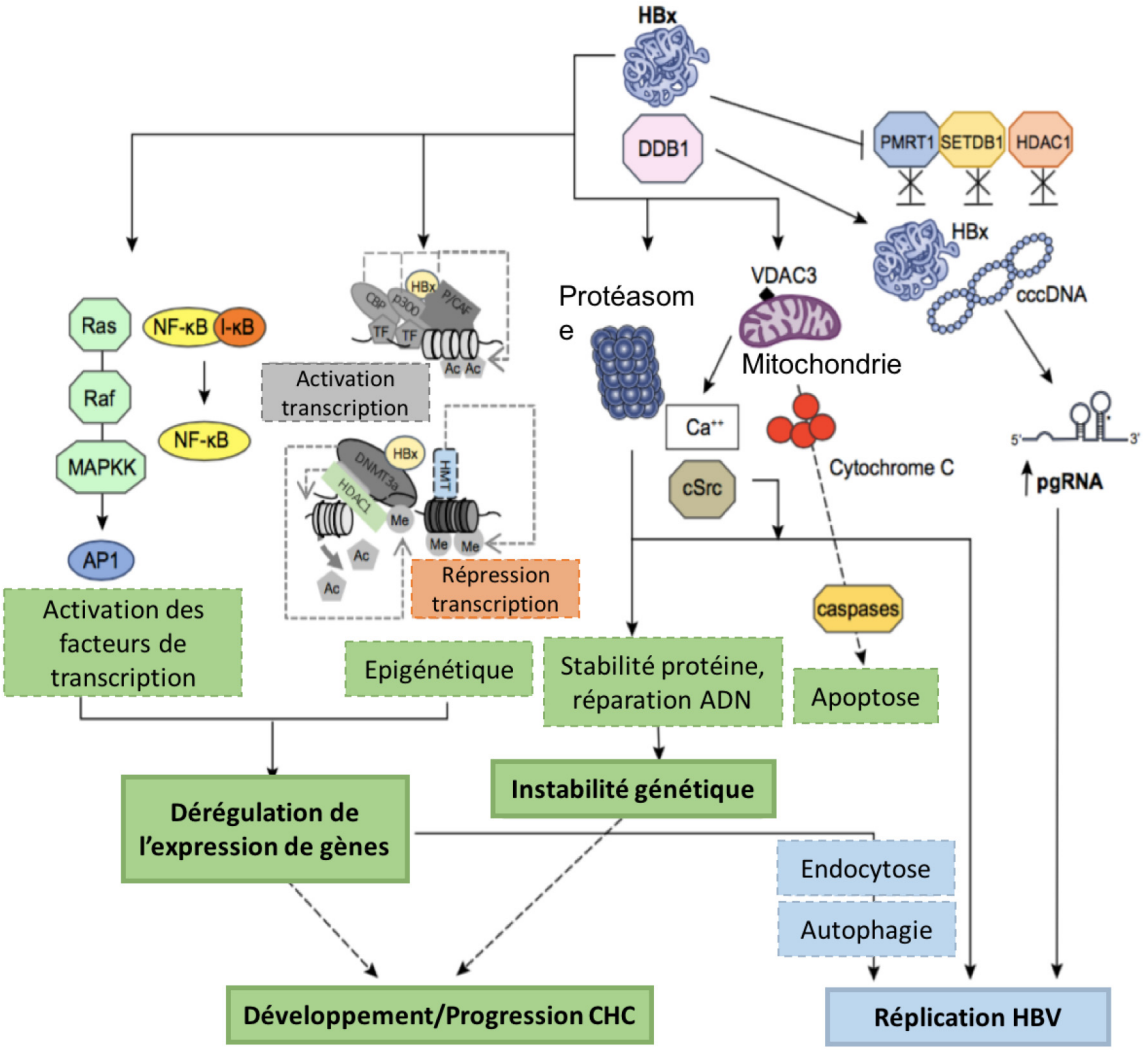


Figure 34 **Rôle de HBx dans la réplication de HBV et le développement du CHC**

Figure adaptée de [94]

Cependant, même s'il est nécessaire de confirmer les résultats quant à l'effet directement oncogénique de HBx, son rôle en tant que cofacteur de l'oncogenèse est bien accepté [5].
Par exemple, il a été montré chez les souris que HBx semble coopérer avec c-myc ou certains agents chimiques carcinogènes dans l'hépatocarcinogénèse mais n'aurai pas d'effet seul [209, 210]. En effet, l'expression de la forme entière de HBx ou de sa forme tronquée dans des souris transgéniques n'a pas d'effet oncogénique, excepté en combinaison avec un agent carcinogène (DEN) [211].

La fonction de HBx dans la transformation cellulaire reste donc incomprise. On sait que HBx est une protéine avec de multiples interactants et donc de multiples fonctions affectant à la fois la transcription des gènes, les signalisations de transduction, la prolifération, l'apoptose et les mécanismes de réparations de l'ADN. Tout ou une partie de ces activités peuvent contribuer à l'hépatocarcinogénèse. (FIGURE 34)
Dans les paragraphes qui suivent, je vous expose succinctement les différentes actions décrites pour HBx qui pourraient favoriser l'oncogenèse hépatique. Pour chaque information il est très important de garder à l'esprit que le nombre de publications concernant HBx est extrêmement important et que toutes les fonctions attribuées à HBx n'ont pas été confirmées. Un grand nombre des observations dépend principalement du contexte d'étude.

IV.3.2.a. HBx et son activité de transactivation de gènes cellulaires

Comme décrit précédemment HBx est connu pour sa potentielle activité transactivatrice de nombreux gènes cellulaires et viraux. En dehors de son action sur la régulation de la réplication du virus, l'activation de gènes cellulaires affecte de nombreux processus pouvant favoriser l'hépatocarcinogénèse.

HBx agirait comme un transactivateur faible mais il serait capable d'activer différents promoteurs dépendant des polymérases I, II ou III responsables d'un grand nombre de dérégulation.

Récemment, une analyse à grande échelle de la chromatine associée à HBx a été effectuée et a permis de mettre en évidence de nombreux sites de liaison de HBx sur la chromatine cellulaire [212].

L'activité de HBx agit à différents niveaux sur la régulation de la transcription :
- La modulation des modifications épigénétiques,
- L'interaction avec les composants de la machinerie transcriptionnelle (TFIIB, TFIIH, RPB5, and TBP)
- L'interaction avec des facteurs de transcription (CREB/ATF, ATF2, C/EBP, ATF3, NF-IL-6, Oct1, SMAD4, and SREBP1)
- La coactivation d'enzymes de modifications de la chromatine (CBP, p300 at PCAF) [97].

Toutes ces interactions pourraient participer à l'activation ou à la répression de la transcription.

De façon non exhaustive, HBx semble impliquée dans: [97]

-la **prolifération cellulaire** en activant l'expression de gènes tels que c-jun, c-fos, PCNA ou la cycline D1,
-**l'angiogenèse** par l'expression du VEGF (vascular endothelial growth factor) et IL8 [213] et la stabilisation des voies impliquant HIFα et ANG2 [94],
- la favorisation de la **fibrose et la cirrhose** notamment en induisant le TGF-β [214],
- L'expression des gènes à travers la **régulation épigénétique**, de par l'augmentation de la régulation des méthyltransférases de l'ADN (DNMT1, DNMT3A1, and DNMT3A2). HBx provoque ainsi des régions hyperméthylées à l'origine de l'inactivation de certains gènes tel que l'E-cadhérine ou le suppresseur de tumeur $p16^{INK4A}$ [215, 216],
-L**'autophagie**, à travers l'induction de beclin-1, une protéine nécessaire à l'inhibition de l'autophagie médiée par Bcl-2 [217] dérégulant ainsi dans le maintien de l'homéostasie des organelles endommagées et la réponse aux stress de l'environnement médiés par l'autophagie.

L'activité transcriptionnelle de HBx pourrait également être liée à sa capacité à activer des voies de signalisation de la transduction dans la cellule. C'est principalement la fraction cytoplasmique de HBx qui jouerait ce rôle. Les multiples études montrent principalement une dérégulation des voies des MAPK et JNK [168] par, entre autres, l'activation de la famille des Scr via la dérégulation du calcium cytosolique.

IV.3.2.b. Implication de HBx sur la sénescence

Lors de l'infection chronique par HBV l'inflammation et les stress oxydatif et oncogénique accélèrent la sénescence des hépatocytes et l'on voit progressivement au cours de la pathologie la longueur de télomères raccourcir. Or, de nombreuses études montrent que les cellules des CHC ont échappé à la sénescence en augmentant leur activité télomérase.
On retrouve d'ailleurs dans un grand nombre de CHC une mutation spécifique au niveau du promoteur du gène TERT, cependant les CHC d'origine HBV semblent moins concernés par cette mutation. En effet dans ce type de cancer, c'est principalement la réactivation de l'activité télomérase par d'autres mécanismes comme l'intégration de séquence HBV au niveau du gène TERT, ou la surexpression de TERT par les protéines HBx et PréS2 qui sont observés.

IV.3.2.c. HBx et mort cellulaire

Les mécanismes et voie de signalisation conduisant à l'apoptose sont souvent dérégulés par les virus. L'apoptose est la première ligne de défense de la cellule face à une infection, un grand nombre de virus interagissent donc avec ce processus.
Les virus peuvent développer des stratégies anti-apoptotiques de façon à établir une infection persistante, ou au contraire certains virus non lytiques ont mis en place des stratégies pro-apoptotiques de façon à libérer les nouveaux virions pour disséminer l'infection et échapper au système inflammatoire [106].

Les nombreuses études sur HBx apportent une fois encore des résultats contradictoires sur le rôle de HBx et montrent cette protéine comme ayant à la fois des capacités pro-apoptotiques et anti-apoptotiques.

Un rôle pro-apoptotique

L'expression faible de HBx (à des niveaux physiologiques dans un hépatocyte primaire) augmente la sensibilité des cellules aux stimuli de l'apoptose telle que la privation de facteurs de croissance, le stress oxydatif et les traitements à la doxorubicine ou aux anticorps anti-Fas [218].
L'apoptose entrainée par le virus est responsable de l'inflammation et de cycles continus de mort et régénération cellulaires à l'origine de la transformation des cellules par mutation ou sélection de clones résistants à l'apoptose.

Dans des cellules infectées par HBV, HBx affecte les voies de signalisation du calcium et les mitochondries de part notamment une liaison avec VDAC3 au niveau de la mitochondrie conduisant à une accumulation d'ions calciques dans la mitochondrie, une augmentation des ROS [219] et la libération de cytochrome c, pouvant induire l'apoptose.

Un rôle anti-apoptotique

HBx par divers mécanismes pourrait inhiber l'apoptose induite par TNF, Fas, le TGF-β ou p53.
HBx serait capable d'interagir *in vitro* et *in vivo* avec le suppresseur de tumeur p53 [220].
D'autres virus ont développé des protéines virales pour supprimer les fonctions de p53 et ainsi échapper à l'apoptose, telle que la protéine E6 du papillomavirus ou la grande protéine T du SV40[5].
HBx, pourrait via son interaction avec p53 dans le cytoplasme, le séquestrer et ainsi inhiber son activité [170]. De cette manière HBx inactive de nombreuses activités dépendantes de p53, par exemple HBx pourrait ainsi réguler l'expression de suppresseurs de tumeurs tels que PTEN à travers l'inhibition de p53 [221].

Cependant, l'inhibition du suppresseur de tumeur p53 est fréquemment retrouvée dans un grand nombre de cancer chez l'homme. Dans ce contexte, établir un lien direct entre HBx et p53 reste difficile à l'exception de l'étude de Lereau et al. [222] qui démontre dans les HepaRG une induction de p53 lors de l'interaction entre HBV et l'aflatoxine B1.

IV.3.2.d. HBx impliqué dans la dérégulation du cycle cellulaire

Différentes études ont montré que HBx pourrait augmenter la prolifération des hépatocytes en induisant la transition de la phase G0 à la phase G1 (notamment via l'augmentation du calcium cytosolique), stimulant ainsi la progression dans le cycle cellulaire d'hépatocytes différenciés, alors qu'au contraire, il conduit dans des cellules dédifférenciées à un blocage en phase S. Les travaux de Quetier et al. [223] suggèrent que la présence HBx pourrait retarder la régénération cellulaire hépatique.

Comme vu précédemment HBx est impliqué dans la dérégulation des phases de mitoses et induit de ce fait une instabilité génétique, notamment via son interaction avec DDB1 ou HBXIP.

[5] SV40 : Polyomavirus qui infecte les hommes et les singes, il peut induire la transformation des cellules et est connu pour causer des tumeurs chez les rongeurs

De plus, HBx est également connue pour cibler Plk1 (Polo-like kinase 1) [224], une sérine/thréonine kinase qui joue un rôle essentiel dans le contrôle du cycle cellulaire et pourrait être un facteur proviral important en favorisant la réplication de HBV [225]. L'activation de Plk1 par HBx peut conduire à des effets mutagènes à la suite de stress génotoxique [224].

IV.3.2.e. HBx et réparation de l'ADN

Le génome cellulaire est constamment soumis à des signaux endogènes ou exogènes qui peuvent porter atteinte à son intégrité. Pour lutter contre les dommages à l'ADN, les enzymes de réparations de l'ADN scannent le génome à la recherche de cassures dans l'ADN ou de mésappariements dus à des mutations. Il existe 5 voies de réparation de l'ADN en charge des différents dommages pouvant survenir sur l'ADN : la recombinaison homologue (HR), la voie des jonctions d'extrémités non homologue (NHEJ- Non homologous end joining), la voie des mésappariements (MMR- Mismatch repair) la réparation par excision de nucléotide (NER- nucleotide excison repair)), la réparation par excision de base (BER- Base excision repair). Des dérégulations dans ces mécanismes conduisent à l'accumulation de mutations et prédisposent les cellules à la transformation cellulaire.

Nous l'avons vu précédemment HBx interagit et dérégule un grand nombre de protéines dont certaines sont impliquées dans des voies de réparation de l'ADN telles que TFIIH ou p53.

De trop nombreuses études ont cherché à comprendre l'implication de HBx dans la dérégulation des mécanismes de réparations de l'ADN. Il est impossible de citer ici tous ces travaux dont l'essentiel sera discuté dans l'étude 3 de ce manuscrit.

Encore une fois, comme vous avez pu le voir dans les paragraphes précédents, l'abondance de résultats rend l'analyse et l'interprétation extrêmement difficile et la synthèse de tous ces résultats est compliquée. Ceci n'est qu'un résumé des nombreuses publications.

Résultats

V. Objectifs des travaux de thèse

Comme nous l'avons vu dans l'introduction bibliographique, la protéine HBx du virus de l'hépatite B a été décrite par un nombre impressionnant de publications depuis sa découverte. Il s'agit de la seule protéine non structurale du virus, en dehors de la polymérase virale, elle est extrêmement conservée dans les différents types d'*hepadnavirus* et sa structure ne permet pas d'en définir une fonction précise. Parmi toutes les fonctions attribuées à HBx, deux grands mécanismes peuvent être mis en évidence : HBx est indispensable à la réplication du virus et participe à la transformation des cellules même s'il ne s'agit pas directement d'une protéine oncogénique.

La quantité d'informations accumulées sur HBx et ses partenaires pourrait être un avantage mais la découverte tardive de modèles d'études *in vitro* optimaux ont conduit nombre de publications à utiliser des modèles d'études qui ne reflètent pas les conditions physiologiques, notamment des surexpressions de la protéine HBx seule, à des niveaux extrêmement plus importants que lors d'une infection naturelle. Les difficultés rencontrées étaient énormes en l'absence de modèles permissifs à une infection par le virus HBV. Les moyens alternatifs mis en œuvre (transfections de lignées hépatocytaires) ont permis des découvertes importantes sur le rôle de HBx et il est bien évident que tous les résultats obtenus sont loin d'être sans intérêt même s'ils sont trop souvent valables uniquement dans des contextes particuliers et rares. La mise au point de nouveaux modèles d'études comme la culture primaire d'hépatocytes humains et la découverte de la lignée HepaRG, seuls modèles capables d'être infectés naturellement *in vitro*, ont permis des avancées, plus pertinentes physiologiquement, sur la réplication du virus, l'ADN viral, le récepteur d'entrée, et la protéine HBx.

Profitant de l'expertise du laboratoire dans la préparation des hépatocytes primaires et la culture des cellules HepaRG ainsi que des protocoles d'infection mis en place, **l'objectif principal de ma thèse est de comprendre et de préciser le rôle de HBx** grâce à ces outils.

La première partie de ces résultats repose sur le rôle de HBx dans l'infection virale et la régulation de l'ADNccc. Grâce à la collaboration avec l'équipe de Christine Neuveut (Paris) connue pour son expertise dans l'étude des modifications épigénétiques et les partenaires de HBx, nous avons confirmé dans un modèle d'infection *in vitro* que HBx était impliquée dans la régulation transcriptionnelle de l'ADNccc. En effet en l'absence de HBx nous avons mis en évidence des modifications post traductionnelles sur les histones caractérisant une répression de la transcription, associée à une compaction plus importante du minichromosome.
Les résultats sont présentés sous la forme de l'article que nous avons publié dans *Journal of Hepatology* en Novembre 2015 [226]. Vous trouverez en annexe une version synthétisée et en français des résultats, publiée dans *Médecine/Science* en 2016 [227].

Dans une seconde étude, nous nous sommes intéressés à l'interaction entre HBx et DDB1 ; cette liaison, bien décrite, permet le recrutement de la protéine HBx au sein d'un

complexe E3-ubiquitine ligase. Cependant, les protéines ciblées par ce complexe étaient, jusqu'à présent, inconnues. Pour cela nous avons rejoint par collaboration les travaux de l'équipe de Michel Strubin (Genève) experte dans l'association entre HBx et DDB1. Une approche de spectrométrie de masse nous a permis de mettre en évidence la cible principale du complexe E3 ubiquitine ligase/DDB1/HBx : le complexe SMC5/6. La mise en commun de nos expertises, ChIP, essai de transactivation à Genève, infections et monitoring de cellules primaires à Lyon, nous a par la suite permis de montrer que le complexe SMC5/6 peut être considéré comme un facteur de restriction de HBV. Il permet de bloquer la transcription de l'ADNccc en l'absence de la protéine HBx. En effet, HBx permet de recruter SMC5/6 au sein du complexe DDB1-E3 ubiquitine ligase pour induire sa dégradation. Les résultats de cette étude vous seront présentés sous la forme de l'article publié en mars 2016 dans la revue *Nature* [228]. Les résultats ont été synthétisés en français dans une nouvelle publiée dans *Médecine/Sciences* que vous trouverez en annexe [229].

Le complexe SMC5/6 est connu, entre autres, pour son implication dans les mécanismes de réparation de l'ADN. La dégradation de ce facteur par HBx dans une cellule infectée pourrait donc engendrer une dérégulation des mécanismes de défense de la cellule face aux dommages à l'ADN ce qui pourrait participer à l'instabilité génétique responsable de la transformation des hépatocytes au cours de l'oncogenèse, mais aussi affecter le métabolisme des cellules cancéreuses. C'est dans cette optique que nous avons initié les travaux présentés et discutés dans la troisième étude, menés grâce à l'expertise de Janet Hall (Institut Curie – Paris), nouvellement arrivée dans notre laboratoire.

En effet, les travaux publiés précédemment au sein de l'équipe ont montré que (i) la radiothérapie s'avère une option en partie efficace pour traiter les CHC [190], (ii) que *in vitro* les lignées cancéreuses d'hépatocytes étaient sensibles aux radiations ionisantes et (iii) que l'utilisation d'inhibiteurs de la DDR en combinaison avec les RI permettait de diminuer la survie des cellules [230]. Les travaux de l'étude 3 de ce manuscrit reposent sur l'utilisation de la combinaison inhibiteurs de DDR et de radiations ionisantes dans un contexte de cellules cancéreuses exprimant les protéines virales de HBV notamment HBx. Notre hypothèse de travail est basée sur l'idée que les cellules exprimant HBx, et donc sans complexe SMC5/6, pourraient être plus sensibles à la combinaison d'inhibiteurs de DDR et RI. Les résultats de cette étude vous seront présentés avec les figures dans le format « article » car le papier, pour lequel je serai premier auteur, est au moment de l'écriture de ce manuscrit en cours de rédaction.

VI. Etude 1 : Implication de HBx dans la régulation épigénétique de l'ADNccc

Plan

VI. Etude 1 : Implication de HBx dans la régulation épigénétique de l'ADNccc128

.....128
VI.1. Introduction de l'étude 1 128
VI.2. Nos travaux 130
VI.3. Article 130
VI.4. Discussion de l'étude 1 140

VI.1. Introduction de l'étude 1

Le maintien de l'ADNccc et sa transcription dans une cellule infectée sont les causes principales de la résistance aux thérapies actuelles. Plusieurs études ont montré que cet ADN viral, associé à des histones cellulaires, prenait la forme d'un minichromosome viral soumis aux mêmes régulations épigénétiques que l'ADN cellulaire (voir le paragraphe I.3, page 46). En effet, l'organisation de l'ADN sous forme de chromatine le protège et le rend plus ou moins accessible aux facteurs de transcription. L'activation de la transcription des gènes dépend donc de mécanismes permettant d'augmenter l'accessibilité de l'ADN aux ARN polymérases soit en déplaçant les nucléosomes sur l'ADN, soit en réduisant les forces permettant son association aux histones via des modifications post-traductionnelles.

Par conséquent la transcription active de l'ADN viral est caractérisée notamment par une hyperacétylation des histones, mais les mécanismes mis en jeu ne sont pas bien décrits. La protéine HBx est au cœur de cette régulation.

Des travaux antérieurs reposant sur des modèles de transfection de l'ADN viral pour former un minichromosome artificiel, ont permis de mettre en évidence l'implication de HBx dans les modifications épigénétiques de l'ADNccc [62]. En l'absence de HBx, la transcription de l'ADNccc est inhibée et l'on retrouve des marqueurs de transcription inactive sur les histones. Au contraire la présence de HBx permet la transcription de l'ADN viral. (pour plus d'informations voir le paragraphe II.2.2 page 72)

Le but de cette étude est de comprendre le rôle de la régulation épigénétique de la chromatine au niveau de la régulation transcriptionnelle de l'ADNccc dans des conditions d'infection *in vitro* de cellules primaires (PHH) et de cellules HepaRG. L'utilisation de deux modèles de virions : HBV sauvage (HBV WT) ou HBV muté pour l'expression de HBx (HBV X-) nous a permis d'étudier la composition de l'ADNccc en présence ou en l'absence de la protéine HBx.

Tableau 3 **Types, marques et fonctions des modifications de la chromatine**

Modifications de la chromatine			
Marques (sur l'ADN ou les histones)		Sites	Fonction
Méthylation de l'ADN	Cytosines méthylées (meC)	îlots CpG	Répression
Modifications post traductionnelles des histones	Lysines acétylées (K Ac)	H3 (9,14, 18, 56) H4 (5,8,13, 16) H2A, H2B	Activation
	Sérines/Thréonines phosphorylées (S/T)	H3 (3, 10, 28) H2A, H2B	Activation
	Arginines méthylées (R Me)	H3(17,28) H4 (3)	Activation
	Lysines méthylées (K Me)	H3 (4, 36, 79)	Activation
		H3 (9, 27) H4 (20)	Répression
	Lysines ubiquitunées (K Ub)	H2B (120)	Activation
		H2A (119)	Répression
	Lysines sumoylées (K Su)	H2B (6/7) H2A (126)	Répression

Les nombres entre parenthèses indiquent les résidus des acides aminés touchés par les modifications.
Tableau adapté de [52]

VI.2. Nos travaux

Les résultats de cette étude ont permis de confirmer que la transcription du virus HBV était réprimée en l'absence d'HBx. Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la transcription des gènes de HBV, nous avons étudié la structure de l'ADNccc formé après infection des cellules par les virus HBV WT ou HBV X-. En évaluant la sensibilité de l'ADNccc à la digestion par la nucléase micrococcale, nous avons pu montrer que l'ADNccc du HBV X- était plus résistant à la digestion que l'ADNccc du HBV WT, suggérant une structure de l'ADN plus compacte en l'absence de HBx.

De plus, comme décrit dans [55], nous avons utilisé des approches de ChIP sur l'ADNccc qui combinent immunoprécipitation de la chromatine et PCR quantitative (qPCR) pour isoler et caractériser l'ADNccc de cellules infectées. Un traitement spécifique à la nucléase plasmide safe de l'ADN immunoprécipité, associé à des couples d'amorces spécifiques permet de discriminer l'ADNccc nucléaire de l'ADN-RC. Ainsi, nous avons pu observer des marques de répression de la transcription sur l'ADNccc à savoir : une diminution de l'acétylation de l'histone H3 et de la triméthylation de la lysine K4 (H3K4me3) au profit d'une augmentation de la di- et tri-méthylation de cette même histone sur la lysine K9 (H3K9me). (**Tableau 3**) De plus, on observe le recrutement du facteur HP1, protéine de l'hétérochromatine et marqueur d'une chromatine condensée, cohérent avec une forme plus condensée du minichromosome viral en l'absence de HBx. Les marques inverses sont retrouvées lorsque l'on ré-exprime HBx dans un contexte de HBV X-. HBx permet de rétablir la réplication du virus.

Enfin, via des analyses par ARN interférence, nous avons pu démontrer que SETDB1 est la principale histone méthyltransférase responsable de la triméthylation de l'histone H3 au niveau de la lysine 9 (H3K9me3) et participe donc à la répression de la transcription de HBV.
Par conséquent, nous décrivons dans cet article que lors d'une infection par HBV, SETBD1 et HP1 sont recrutés au niveau de l'ADN viral pour induire une inhibition épigénétique de l'ADNccc et donc une répression transcriptionnelle de HBV. HBx est capable de lever cette répression en rétablissant une chromatine active.

VI.3. Article

Research Article

EASL JOURNAL OF HEPATOLOGY

HBx relieves chromatin-mediated transcriptional repression of hepatitis B viral cccDNA involving SETDB1 histone methyltransferase

Lise Rivière[1,2], Laetitia Gerossier[3], Aurélie Ducroux[1,2,4], Sarah Dion[5], Qiang Deng[5,6], Marie-Louise Michel[5], Marie-Annick Buendia[7], Olivier Hantz[3], Christine Neuveut[1,2,*]

[1]*Unité des Hépacivirus et Immunité Innée, Institut Pasteur, 28 rue du Dr. Roux, 75015 Paris, France;* [2]*UMR CNRS 3569, 28 rue du Dr. Roux, 75015 Paris, France;* [3]*Inserm U1052, CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Université de Lyon, F-69000 Lyon, France;* [4]*Institute for Experimental Virology, Group Innate Immunity and Viral Evasion, 30625 Hannover, Germany*[†]*;* [5]*Laboratoire de Pathogenèse des Virus de l'Hépatite B, Département de Virologie, Institut Pasteur, 75015 Paris, France;* [6]*Laboratory of Molecular Virology and Immunology, Institute Pasteur of Shanghai, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China*[†]*;* [7]*Inserm Unit U785, University Paris-Sud, Paul Brousse Hospital, 12 Avenue Paul Vaillant Couturier, 94800 Villejuif, France*

Background & Aims: Maintenance of the covalently closed circular HBV DNA (cccDNA) that serves as a template for HBV transcription is responsible for the failure of antiviral therapies. While studies in chronic hepatitis patients have shown that high viremia correlates with hyperacetylation of cccDNA-associated histones, the molecular mechanisms controlling cccDNA stability and transcriptional regulation are still poorly understood. This study aimed to decipher the role of chromatin and chromatin modifier proteins on HBV transcription.

Methods: We analyzed the chromatin structure of actively transcribed or silenced cccDNA by infecting primary human hepatocytes and differentiated HepaRG cells with wild-type virus or virus deficient (HBVX-) for the expression of hepatitis B virus X protein (HBx), that is required for HBV expression.

Results: In the absence of HBx, HBV cccDNA was transcriptionally silenced with the concomitant decrease of histone 3 (H3) acetylation and H3K4me3, increase of H3 di- and tri-methylation (H3K9me) and the recruitment of heterochromatin protein 1 factors (HP1) that correlate with condensed chromatin. SETDB1 was found to be the main histone methyltransferase responsible for the deposition of H3K9me3 and HBV repression. Finally, full transcriptional reactivation of HBVX- upon HBx re-expression correlated with an increase of histone acetylation and H3K4me3, and a concomitant decrease of HP1 binding and of H3K9me3 on the cccDNA.

Conclusion: Upon HBV infection, cellular mechanisms involving SETDB1-mediated H3K9me3 and HP1 induce silencing of HBV cccDNA transcription through modulation of chromatin structure. HBx is able to relieve this repression and allow the establishment of active chromatin.

© 2015 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: HBV; cccDNA regulation; Epigenetic; SETDB1; HBx; HP1.

Received 4 March 2015; received in revised form 16 June 2015; accepted 24 June 2015; available online 2 July 2015

* Corresponding author. Address: Unité des Hépacivirus et Immunité Innée, URA CNRS 3015, Institut Pasteur, 28 rue du Dr. Roux, 75015 Paris, France. Tel.: +33 1 45 68 87 76; fax: +33 1 40 61 30 12.

E-mail address: christine.neuveut@pasteur.fr (C. Neuveut).

† Present address.

Abbreviations: HBV, Hepatitis B Virus; pgRNA, pre-genomic RNA; RC-DNA, relaxed-circular HBV DNA; cccDNA, covalently closed circular HBV DNA; CBP, CREB-binding protein; PCAF, p300/CREB-binding Protein-associated Factor; H3, H4, histone 3, histone 4; HDAC1, histone deacetylase 1; PRC2, Polycomb Repressive Complex 2; HBx, Hepatitis B Virus X protein; H3K9me, histone 3 methylated on lysine 9; AcH3, acetylated histone 3; HKMT, histone lysine methyl transferase; SETDB1, SET domain bifurcated 1; HP1, heterochromatin protein 1; vp, viral particles; MOI, multiplicity of infection; dHepaRG, differentiated HepaRG; PHH, primary human hepatocytes; HBeAg, hepatitis B virus e antigen; TSA, trichostatin A; MNase, Micrococcal Nuclease; CCNA2, cyclin A2; HBc, HBV core protein; ERV, endogenous retrovirus; mESC, mouse embryonic stem cell; hCMV, human cytomegalovirus.

Introduction

Despite an effective preventive vaccine, chronic hepatitis B virus (HBV) infection remains a major health problem worldwide [1]. HBV is a small enveloped DNA virus which replicates its genome in the cytoplasm via reverse transcription of the encapsidated pre-genomic RNA (pgRNA) into a circular partially double-stranded DNA (RC-DNA). Upon infection, the encapsidated RC-DNA is imported into the nucleus where it is converted into covalently closed circular DNA (cccDNA) that serves as a template for the transcription of all viral RNAs. Antiviral treatments of chronic HBV carriers lead to successful viral suppression but cannot clear the viral cccDNA from infected hepatocytes, which constitute a viral reservoir liable for viral rebound at the end of antiviral treatment [2].

HBV cccDNA is organized into a chromatin-like structure associated with histone and non-histone proteins [3]. Like cellular genes, HBV transcription might be regulated through chromatin organization and modulation of epigenetic marks. This is supported by studies showing that transcription of cccDNA following transfection of hepatoma cells with a linear HBV genome

Research Article

correlates with the recruitment of histone acetyltransferases CBP/p300 and PCAF and with histone 3 (H3) and 4 (H4) hyperacetylation [4,5]. Conversely, transcriptional silencing correlates with the recruitment of HDAC1 and Sirt1 histone deacetylases and with histone hypoacetylation. Relevant to the role of chromatin in HBV transcription, knockdown of CBP and P300 reduces HBV transcription [6]. A recent study showed that interferon-α represses viral transcription via epigenetic mechanisms involving the chromatin remodeling Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) [7]. Furthermore, in chronic hepatitis patients, high viremia correlates with H3 and H4 hyperacetylation [5].

The regulatory protein HBx is essential for viral replication *in vivo* and is believed to act primarily at the level of transcription [8–10]. In the setting of infection, HBx expression was shown to be essential for HBV RNA expression [11]. The mechanism involved remains however unclear. Still, activation of HBV transcription by HBx is likely linked to chromatin modulation, as the recruitment of HBx to reconstituted cccDNA correlates with the recruitment of HBx partners CBP and P300, PCAF, H3 acetylation and HBV transcription [4,12]. Moreover, we showed that HBx activates HBV transcription through the inhibition of cellular factors involved in transcriptional and chromatin regulation, such as the PP1/HDAC1 complex and PRMT1 [6,13].

Methylation of H3 on lysine 9 (H3K9me) is associated with gene silencing and mediated by histone lysine methyltransferases (HKMT) including SETDB1 [14–17]. Heterochromatin formation and gene silencing is believed to be mediated through the recruitment of the HP1 family of heterochromatin proteins to methylated H3K9me3 and maintained through a self-sustaining loop in which HP1 binds to methylated H3K9me3 and recruits more HKMT [18–21].

In the present study, we used models of primary hepatocytes and HepaRG cells infected with HBV or a mutant defective for HBx expression (HBVX-) to show that cccDNA transcription is regulated via chromatin structure modulation, and that in the absence of HBx, HBV silencing is associated not only with deacetylation of histones but also with the deposition of the repressive mark H3K9me3 and the recruitment of HP1 factors. Moreover, we present evidence that SETDB1 is involved in the establishment of chromatin-mediated transcriptional silencing of the cccDNA.

Materials and methods

Cell culture, HBV production and infection

Details for cells are described in Supplementary methods.

For HBV particles production, cells were grown in Williams E medium with 5% FCS, 7×10^{-5} M hydrocortisone hemisuccinate, 5 μg/ml insulin and 2% DMSO. HBV particles were concentrated from the clarified supernatant by overnight precipitation with 5% PEG 8000 and centrifugation at 4 °C for 60 min at 5000 rpm. Enveloped DNA-containing viral particles were tittered by immunoprecipitation with an anti-PreS1 antibody (kindly provided by C. Sureau) followed by qPCR quantification of viral RC-DNA with the primers RC 5′ and RC 3′ (Supplementary Table 2) [6]. Differentiated HepaRG (dHepaRG) cells or PHH were infected as previously described with normalized amounts of virus at the indicated multiplicity of infection (MOI) [11].

Recombinant HBV deficient for the expression of the core protein (rHBV HBc-) has been described previously [22]. The virus is produced after transfection of HepG2 cells with the prHBV1.3/HBV core protein construct. This plasmid contains 1.3-fold HBV genome carrying a substitution of a fragment of 325 nt within the core gene with an in frame fragment of 180 nt encoding a Flag peptide. The resulting fusion protein only contains the 27 first amino acids of the core protein fused to a Flag peptide. Moreover the plasmid contains the core protein (HBc) under the control of the SV40 promoter. This recombinant virus has been shown to complete the replicative cycle and to be successfully encapsidated.

For infection, only enveloped DNA-containing viral particles (vp) were taken into account to determine the MOI.

Lentiviral vectors and shRNA

Experimental details, lentiviral vectors and hairpin shRNA sequences (Supplementary Table 1) are described in Supplementary methods.

Quantitative RT-PCR (RT-qPCR)

RT-qPCR experiments were carried out as previously described [13]. Details for the RT-qPCR experiments and primers (in Supplementary Table 2) are described in Supplementary methods.

Quantification of cccDNA

cccDNA quantification has been described [23]. Briefly, for nuclei isolation, cells were incubated for 15 min at 4 °C in buffer I (10 mM Hepes pH 8, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl) and lysed with 1% NP-40. After centrifugation, and washing in buffer I, nuclei were resuspended in 50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8.3, 2.5 mM $MgCl_2$. and lysed with an equal volume of buffer containing 0.5% NP40, 0.5% Tween, 2.5 mM $MgCl_2$. After proteinase K treatment, and phenol chloroform extraction, qPCR was performed using HBV cccDNA specific primers (Supplementary Table 2). The viral genome equivalent copies were calculated based on a standard curve generated with known copy numbers of a plasmid containing an HBV genome of greater than unit length (payw1.2). Samples were normalized to cell number by qPCR amplification of the IL8 promoter with the IL8 prom primers (Supplementary Table 2) and a standard curve generated with known copy numbers of a plasmid containing the human IL8 promoter.

Messenger RNA half-life measurements

Eight days after infection, dHepaRG cells were treated with 5 μg/ml of actinomycin D to inhibit RNA polymerase II activity. Viral RNAs were quantified by RT-qPCR at different times after actinomycin D addition and normalized by the Rhot2 cellular mRNA that was chosen because of its long half-life.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

The hepatitis B virus e antigen (HBeAg) in cells supernatant was essayed with commercial ELISA according to the manufacturer's protocol (Bio-Rad, France).

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

ChIP experiments were carried out on infected cells 8 days post-infection as described with minor modifications [13]. Briefly cells were fixed with 1% formaldehyde for 10 min at 37 °C and quenched with 0.125 M Glycine. For nuclear extracts preparation, cells were lysed in buffer A (0.25% Triton X-100, 10 mM Tris pH8, 0.5 mM pefablock, EDTA-free protease inhibitors (Roche)). After centrifugation, nuclei were washed in buffer B (0.2 M NaCl, 10 mM Tris pH8, 0.5 mM pefablock, EDTA-free protease inhibitors), centrifuged and lysed in nuclei lysis buffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris pH8, 0.5 mM pefablock, EDTA-free protease inhibitors). After sonication, lysates were diluted 1:10 with 0.01% SDS, 1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris pH8, 167 mM NaCl 0.5 mM pefablock, EDTA-free protease inhibitors. Chromatin was then subjected to overnight immunoprecipitation at 4 °C using 2–5 μg of antibodies listed in Supplementary Table 3. Negative controls with nonspecific immunoglobulins (Millipore PP64B) were included in each experiment. Immune complexes were incubated with protein A/protein G agarose beads at 4 °C, washed, and eluted in 1% SDS, 0.1% $NaHCO_3$. Immunoprecipitated DNA was quantified by qPCR using cccDNA specific primers or specific primers for the cyclin A2 promoter (hCCNA2), a cellular gene that is not regulated by HBx (Table 2) [12]. Samples were normalized to input DNA using the ΔCt method were ΔCt = Ct (input) − Ct (immunoprecipitation) and calculated as percentage of the input. Results are expressed as the average of at least three independent experiments. Standard error of the mean (SEM) are indicated. Statistical differences were analyzed by Student's *t* test.

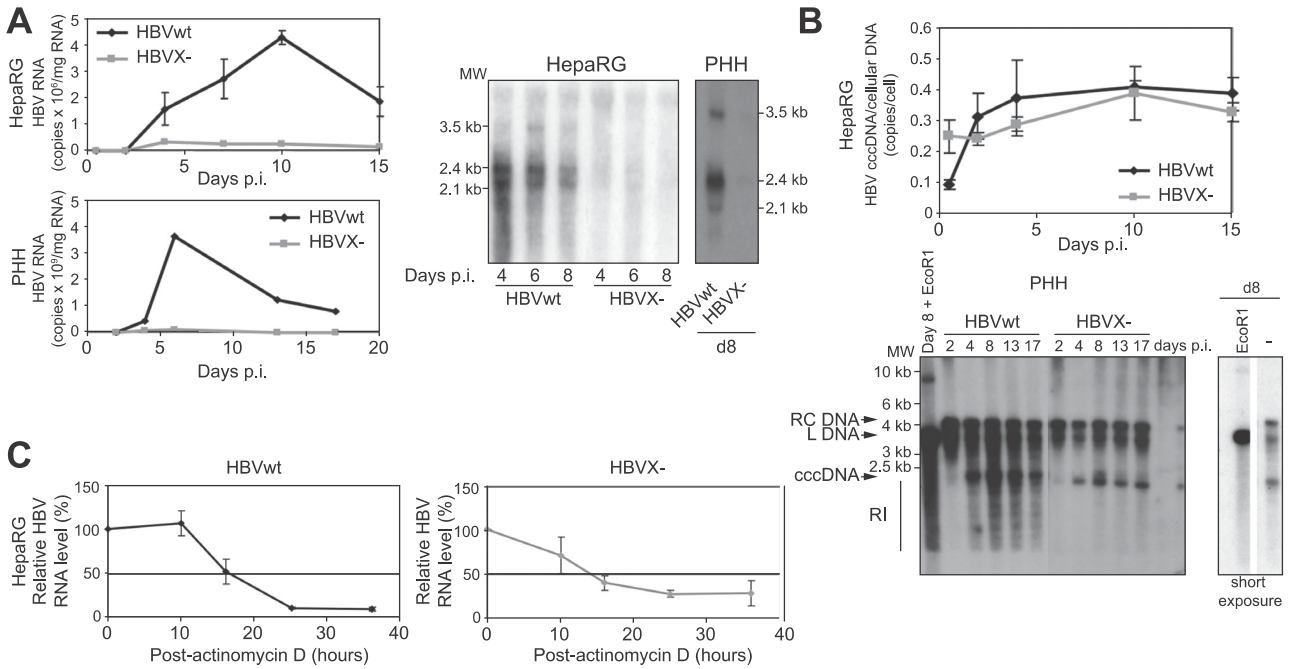


Fig. 1. HBx activates HBV transcription in infected hepatocytes. (A) and (B) PHH or dHepaRG cells were infected with HBVwt or HBVX- at MOI of 100 vp/cell. At indicated time after infection: (A) HBV RNA was analyzed and quantified by RT-qPCR and by Northern blotting. (B) Top panel: nuclear DNA from infected dHepaRG was treated with plasmid safe. The copy numbers of cccDNA per cell was quantified by qPCR. Lower panel: total DNA from infected PHH was analyzed by Southern blot. First lane: EcoRI digestion of total DNA extracted at day 8. Lower exposure is shown. (C) dHepaRG were infected at MOI of 5 vp/cell with HBVwt or HBVX-. At indicated times after addition of actinomycin D, HBV transcription was quantified by RT-qPCR. Transcript level in infected cells at the time 0 was set to 100% for each virus. (A) to (C) Mean ± SEM of at least two experiments are shown.

Micrococcal nuclease digestion of chromatin

Freshly isolated PHH were infected at MOI of 100 vp/cell with HBVwt or HBVX-. Eleven days after infection, nuclei were isolated using the Nuclear & Cytoplasmic Extraction Kit according to the manufacturer instructions (G Biosciences). Nuclei were then resuspended in MNase buffer (28.5 mM sodium borate pH 8.8, 1.4 mM $CaCl_2$) and aliquots were treated with increased concentration of Micrococcal Nuclease (MNase) (0.05 U/ml to 1 U/ml) during 30 min at 37 °C. Reaction was stopped by adding an equal volume of 2× stop buffer (0.5% SDS, 25 mM EDTA). Samples were then treated with 150 μg/ml of RNase A at 37 °C for 30 min and digested with proteinase K (0.8 mg/ml) for 1 h in 45 °C. DNA was extracted by phenol/chloroform, analyzed on 1% agarose gel and transferred to nylon membrane. HBV DNA was detected by hybridization with a ^{32}P labeled full-length HBV DNA probe.

See Supplementary methods for details on drugs and antibodies, Southern blot and Northern blot analysis.

Results

HBx acts on the rate of HBV cccDNA transcription

Since HBx is required for HBV RNA expression in the setting of infection [11], we first assessed whether it acts at the transcriptional or post-transcriptional level by using dHepaRG and primary human hepatocytes (PHH) infected with wild-type HBV (HBVwt) or HBVX- [11]. HBV transcription was analyzed by RT-qPCR and by Northern blot analysis (Fig. 1A). Low levels of pre-genomic, preS1 and preS2/S RNAs accumulation were observed after infection with HBVX- compared to HBVwt, confirming the requirement of HBx for the accumulation of HBV RNAs. Of note, the decrease of HBV RNA levels in the absence of HBx was independent of the MOI (ranging from MOI 1 to MOI 1000, data not shown). Southern blotting and qPCR experiments using primers that amplify the cccDNA confirmed that HBx expression did not significantly influence the formation of cccDNA after infection (Fig. 1B; Supplementary Fig. 1). To examine if the increase of HBV RNA was due to post-transcriptional events that modulate RNA stability, we studied HBV RNAs half-life in dHepaRG cells infected with HBVwt or HBVX-, using the RNA polymerase II inhibitor actinomycin D (Fig. 1C). The half-live of HBV RNAs was approximately 15 h for both HBVwt and HBVX-, showing that HBx has no significant effect on HBV RNAs stability and suggesting that HBx increased the rate of HBV transcription.

HBx regulates HBV transcription through chromatin modifications of the viral cccDNA

Previous studies have suggested that HBx impacts chromatin structure. To gain further insight into HBx modulation of cccDNA chromatin structure, we analyzed Micrococcal Nuclease (MNase) sensitivity of cccDNA extracted from PHH infected with HBVwt or HBVX-. HBVwt cccDNA was more sensitive to MNase digestion than HBVX- cccDNA, showing that HBx expression induced a less compact and more accessible cccDNA chromatin (Fig. 2A).

One mechanism used by DNA viruses to escape cellular silencing mediated through chromatin modifications is to decrease the level of histones associated with the viral DNA [24]. We first compared the level of histones loaded on HBVwt and HBVX- cccDNA by quantitative chromatin immunoprecipitation (ChIP-qPCR)

Research Article

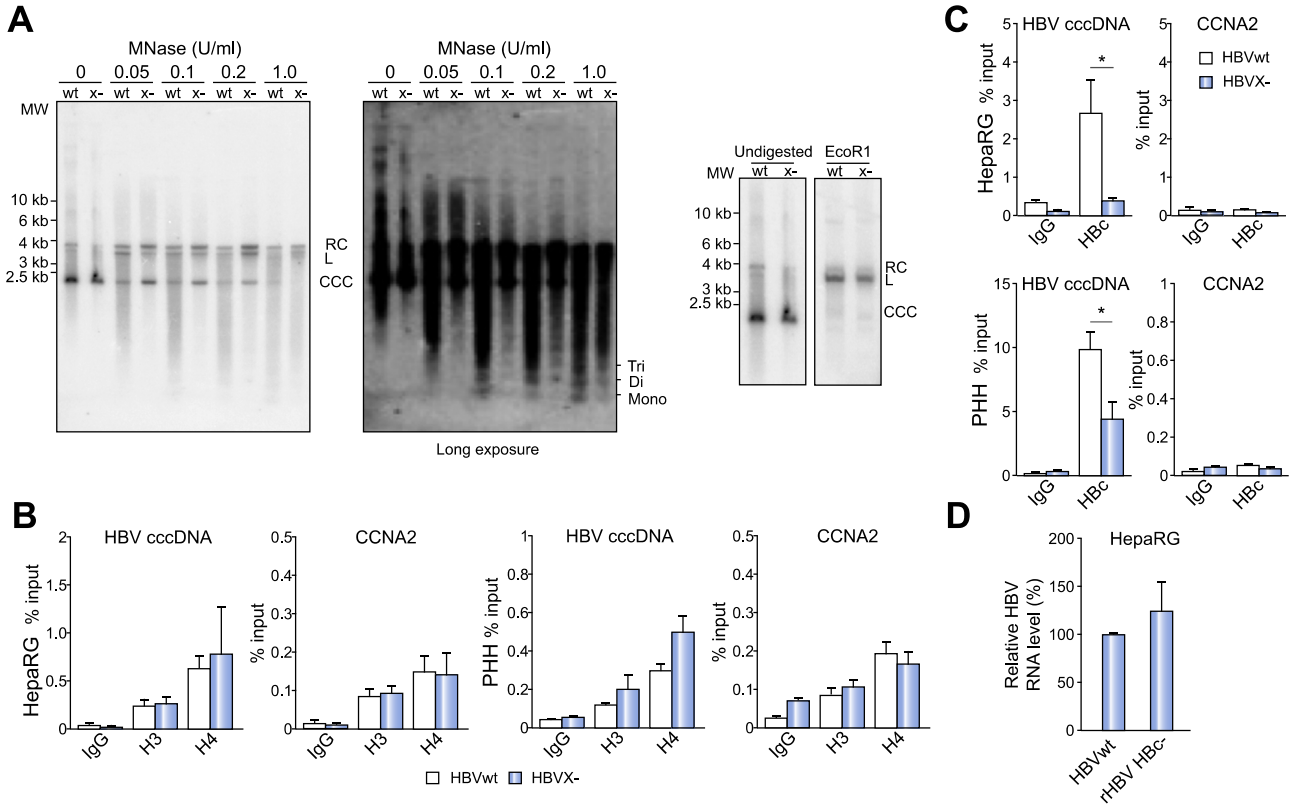


Fig. 2. Effect of HBx on cccDNA chromatin structure. (A) DNA was extracted from infected PHH and chromatin sensitivity assays were performed using increased MNase concentration as indicated. EcoRI digestion was performed in parallel on non-treated samples (right panel). Digested chromatin was subjected to Southern blot. The position of mono-, di- and tri-nucleosomes is indicated. (B and C) PHH or dHepaRG cells were infected at MOI of 100 vp/cell with HBVwt or HBVX-. The level of H3, H4 (B) and core (C) on HBV cccDNA or on the promoter of cyclin A2 gene (CCNA2) was analyzed 8 days post-infection by ChIP-qPCR. (D) dHepaRG cells were infected at MOI of 50 vp/cell with HBVwt or rHBV HBc-. 8 days after infection, HBV transcription was quantified by RT-qPCR. Transcript level in cells infected with HBVwt was set to 100%. (B–D) Mean ± SEM of at least three experiments are shown. *p* values were determined by Student's *t* test (*, $p < 0.05$).

using H3 and H4 antibodies in infected dHepaRG cells or PHH. The recruitment of H3 or H4 to the cccDNA was slightly but not significantly increased for HBVX- cccDNA (Fig. 2B) As a control, the level of H3 and H4 associated to the promoter of cyclin A2 (CCNA2), a cellular gene that is not regulated by HBx, was not modified in infected cells (Fig. 2B).

Since the HBV core protein (HBc) is recruited to the cccDNA and participate in the structural organization of the mini-chromosome [25], we assessed its recruitment to the cccDNA by ChIP-qPCR. The amount of cccDNA immunoprecipitated with anti-core antibodies was 2- to 5-fold higher in dHepaRG cells or PHH infected with HBVwt than in cells infected with HBVX- (Fig. 2C). The core protein was not recruited on the cyclin A2 promoter (Fig. 2C). We then asked whether the decreased recruitment of HBc on HBVX- cccDNA could account for the modification of chromatin structure and transcriptional repression by studying the transcription of an HBV recombinant virus deficient for the expression of the core protein (rHBV HBc-) [22]. We found no significant variation in virus transcription following infection of dHepaRG cells with HBVwt or HBV HBc- (Fig. 2D). These results show that the decreased amount of core protein on the cccDNA does not account for the strong default in HBVX- transcription.

HBVX- transcriptional repression correlates with the establishment of a repressive chromatin structure on HBV cccDNA

To gain insight into the mechanism responsible for the modulation of cccDNA chromatin structure, we then examined the pattern of histone modifications in infected dHepaRG or PHH. We first analyzed global acetylation of H3 and H4 by ChIP-qPCR. The acetylation of H3 bound to HBVX- cccDNA was strongly reduced compared to HBVwt cccDNA in both cell types, while acetylation of H4 bound to HBVwt and HBVX- cccDNA was not significantly different (Fig. 3A). Acetylation of H3 and H4 associated to the promoter of cyclin A2 was similar in cells infected by HBVwt and HBVX-. Similarly, we observed a significant decrease of H3K14ac and H3K18ac on HBVX- cccDNA when analyzing the acetylation status of individual lysines of H3. No significant modification of the level of histone H4 K5 or K8 acetylation was observed between HBVwt and HBV X- cccDNA.

Beside acetylation, histone H3 methylation at specific K residues has been associated with actively transcribed gene promoters [17,26]. We thus examined methylation of H3, including H3K4me3 and H3K79me2, bound to the cccDNA in presence or in absence of HBx. We observed that HBVwt cccDNA was enriched in H3K4me3 and H3K79me2, correlating with active

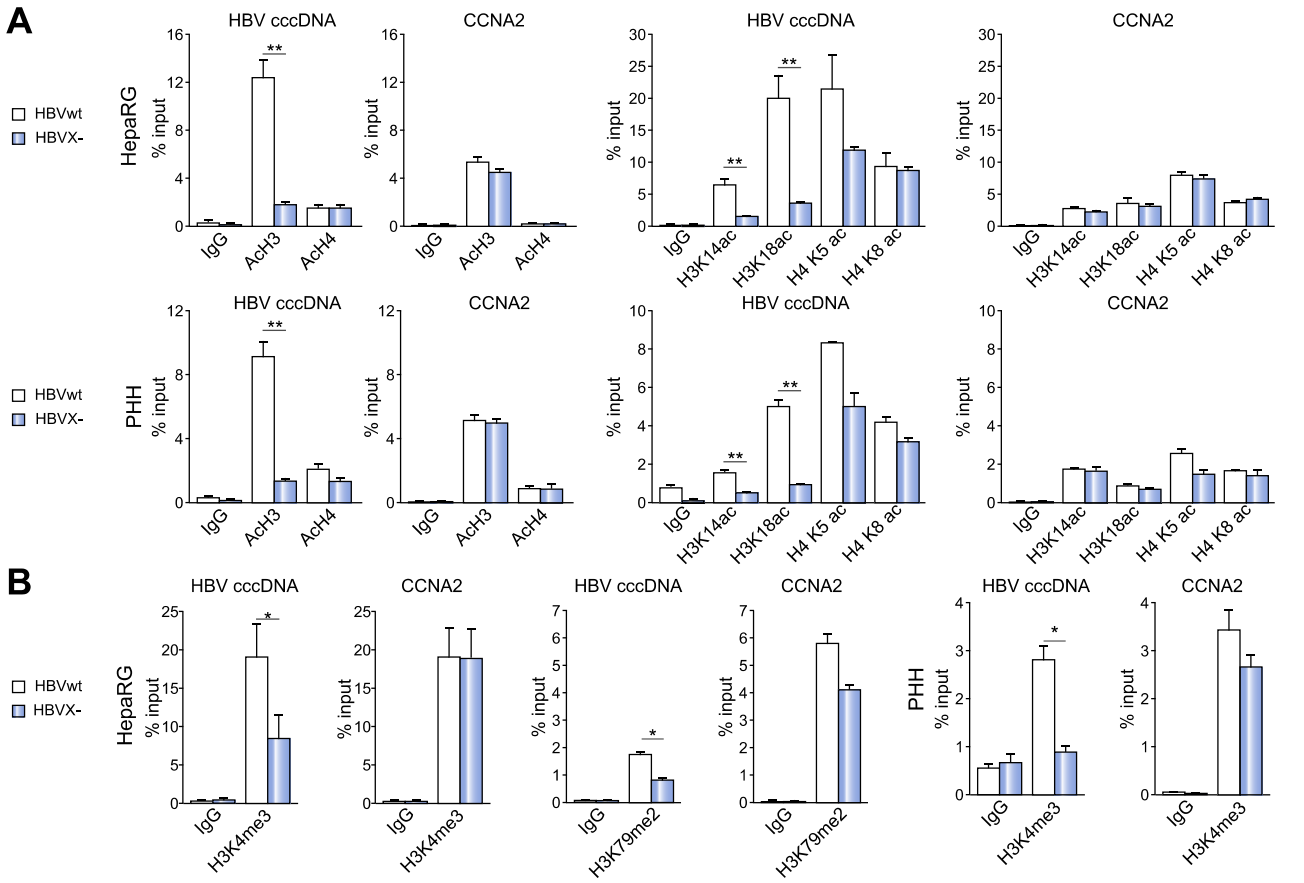


Fig. 3. HBx expression correlates with the increase on the cccDNA of histone marks characteristic of active transcription. PHH or dHepaRG cells were infected at a MOI of 100 vp/cell with HBVwt or HBVX-. (A) The acetylation of histones associated with HBV cccDNA or with CCNA2 promoter was analyzed 8 days after infection by ChIP-qPCR using antibodies directed against pan-acetyl histone H3 or H4 (left panel) or against histones acetylated on specific lysines (right panel). (B) The level of H3K4me3 and H3K79me2, which is associated with elongation, were analyzed 8 days after infection by ChIP-qPCR. Mean ± SEM of at least three experiments are shown. *p* values were determined by Student's *t* test (*, $p < 0.05$).

HBV transcription, while conversely, the levels of H3K4me3 and H3K79me2 were low on HBVX- cccDNA (Fig. 3B, see Fig. 1A).

We next asked whether reduced HBV transcription in cells replicating HBVX- is correlated with repressive histone marks on the cccDNA. To this aim we studied by ChIP-qPCR the presence of H3K9me2, H3K9me3 and H3K27me3 on HBV cccDNA. HBVX- cccDNA was enriched in repressive modifications (mainly H3K9me2 and H3K9me3) compared to HBVwt cccDNA (Fig. 4A, B). These data show that transcriptional repression of HBVX- is associated not only with a decrease in activating marks, but also with the deposition of the highly repressive H3K9me3 and H3K9me2 marks on cccDNA-associated nucleosomes.

The histone methyltransferase SETDB1 is required for HBVX- silencing

Having shown that HBV transcriptional silencing is associated with H3K9me3, we tested whether depletion of histone methyltransferases (HKMT) responsible for H3K9 methylation could revert HBV silencing. To this aim we inhibited the expression of Suv39H1, Suv39H2 and SETDB1 in HepaRG cells using a lentiviral vector containing a doxycycline-inducible short hairpin RNA (shRNA) specific for each HMKT. Efficient knockdown for all target genes was confirmed by RT-qPCR (Fig. 4C, lower graphs). We first analyzed the level of H3K9me3 and acH3 on HBVX- cccDNA and observed that only SETDB1 depletion induced a strong decrease of H3K9me3 (Fig. 4C; Supplementary Fig. 2). AcH3 level did not change upon HMKT depletion. We next studied the impact of HMKTs depletion on HBV transcription and we observed that only depletion of SETDB1 increased the transcription of HBVX- (Fig. 4D).

Together these data suggest that SETDB1 is involved in the silencing of HBVX- cccDNA through the establishment of repressed chromatin.

Recruitment of HP1 on HBVX- cccDNA

We next investigated whether readers of H3K9me3 such as HP1 proteins are recruited to the cccDNA. Recruitment of all three isoforms of HP1 was clearly detected on HBVX- cccDNA, while barely detectable amounts were present on HBVwt cccDNA (Fig. 5A; Supplementary Fig. 3). While HP1α and HP1β were not recruited to the CCNA2 promoter, low levels of HP1γ were detected, but no significant difference was observed between HBVwt and HBVX- infected cells. These results suggest that HP1 proteins are

Research Article

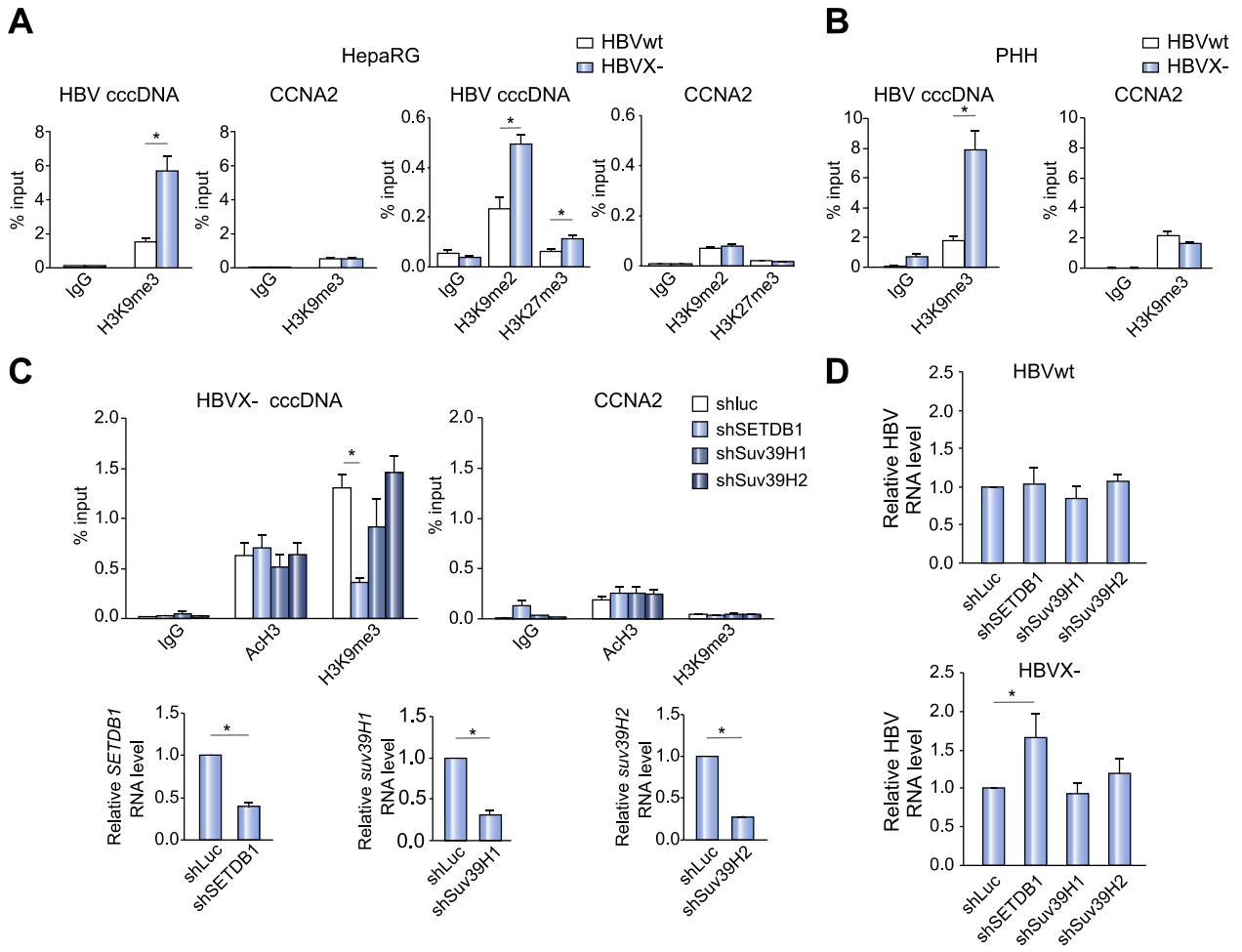


Fig. 4. SETDB1 is required for HBVX- silencing. PHH or dHepaRG cells were infected at a MOI of 100 vp/cell with HBVwt or HBVX-. (A) H3K9me3, H3K9me2 or H3K27me3 levels were analyzed 8 days after infection by ChIP-qPCR in dHepaRG cells. (B) H3K9me3 associated with HBV cccDNA was analyzed 8 days after infection by ChIP in PHH. (A and B) Error bars represent SEM of at least three experiments. *p* values were determined by Student's *t* test (*, $p < 0.05$). (C and D) dHepaRG cells stably expressing a control shRNA (shluc) or shRNAs directed either against SETDB1 (shSETDB1), Suv39H1 (shSuv39H1) or Suv39H2 (shSuv39H2) were treated with doxycycline and infected at MOI of 100 vp/cell with HBVwt or HBVX-. (C) H3K9me3 and acH3 associated with HBVX- cccDNA were analyzed 7 days after infection by ChIP-qPCR (upper panel). The expression of the different HKMTs was analyzed by RT-qPCR (lower panel). Error bars represent SEM of at least three experiments. *p* values were determined by Student's *t* test (*, $p < 0.05$). (D) HBV transcription was analyzed by RT-qPCR 7 days after infection. The level of HBV RNA in dHepaRG shluc cells was set to 1. Error bars represent SEM of at least three experiments. *p* values were determined by Mann Whitney test (*, $p < 0.05$).

recruited to HBVX- cccDNA through interaction with H3K9me3 and contribute to the transcriptional repression of HBVX-.

We then assessed HP1 contribution to the repression of HBVX- transcription, using a previously published dominant-negative mutant of HP1β (HP1βΔN) lacking the N-terminal bromodomain responsible for the interaction with H3K9me [27]. This truncated mutant alters the function of all three isoforms of HP1 by forming non-functional heterodimers. Expression of HP1βΔN using a lentiviral vector (TRIP HP1βΔN) in dHepaRG previously infected with HBVwt or HBVX- is not sufficient to restore HBV transcription (Fig. 5B).

Re-expression of HBx is sufficient to restore HBV transcription and the establishment of active chromatin marks

Re-expression of HBx was shown to restore HBVX- transcription after the establishment of repression [11]. We thus studied whether transcriptional reactivation correlated with a general change in HBV chromatin modifications in dHepaRG cells infected for 8 days with HBVwt or HBVX- and then transduced with a lentiviral vector coding for HA-tagged HBx (TRIP HBx). As shown in Fig. 6A, expression of HBx restored HBVX- transcription, while it had no effect on HBVwt transcription. We observed that HBx not only increased the deposition of active marks such as acH3 and H3K4me3 but also decreased H3K9me3 repressive mark as well as the recruitment of HP1γ on the cccDNA (Fig. 6B; Supplementary Fig. 4). The same observation was made using HepaRG-TR-X expressing V5-tagged HBx in a doxycycline (Dox) inducible manner. Induction of HBx after infection of HepaRG-TRX cells with HBVX- resulted in HBV transcriptional reactivation (Fig. 6C), paralleled with a decrease of histone repressive marks and an increase of active marks on the cccDNA (Fig. 6D).

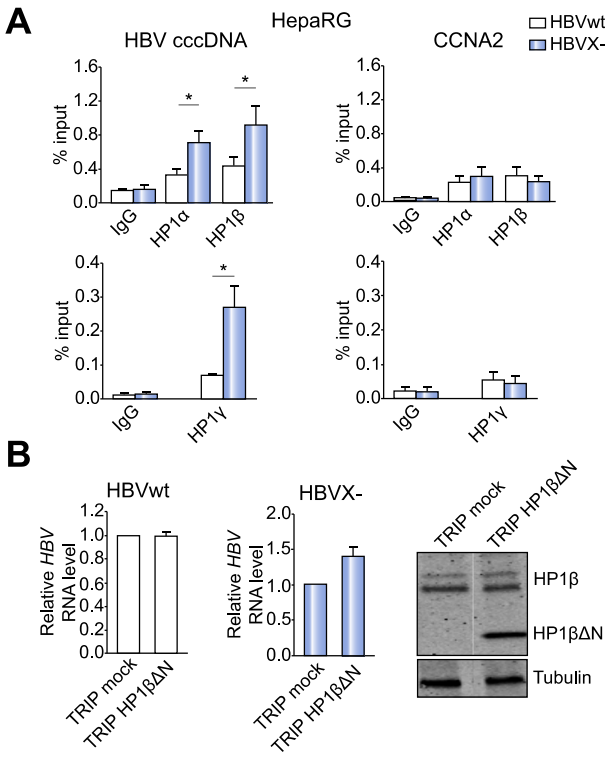


Fig. 5. HP1 proteins are recruited to HBVX- cccDNA. (A) dHepaRG cells were infected at MOI of 100 vp/cell with HBVwt or HBVX-. 8 days post-infection, the association of HP1 isoforms α, β and γ was analyzed by ChIP-qPCR . (B) dHepaRG cells infected at MOI of 100 vp/cell with HBVwt or HBVX- were transduced with either a control lentiviral vector (TRIP Mock) or a lentiviral vector encoding HP1βΔN (TRIP HP1βΔN). HBV transcription was quantified by RT-qPCR 8 days after infection. Transcript level in infected cells was set to 1. Lower panel: HP1βΔN expression was analyzed by Western blot using anti-HP1β antibody. (A and B) Mean ± SEM of at least three experiments are shown. *p* values were determined by Student's *t* test (*, $p < 0.05$).

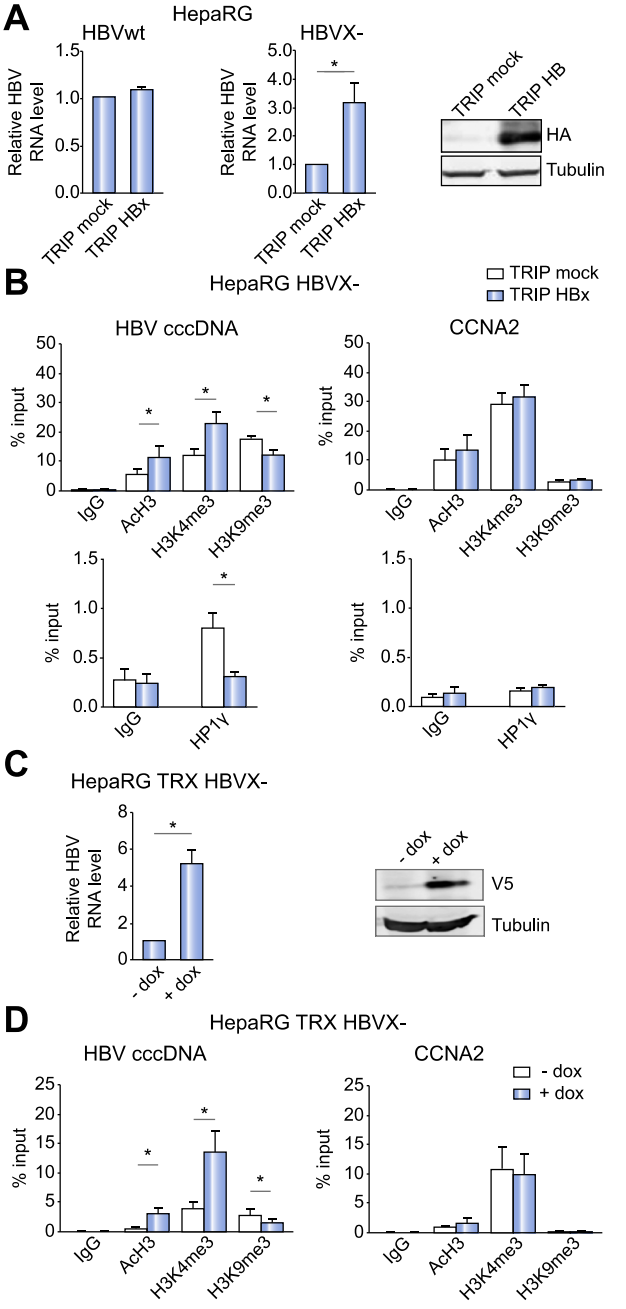


Fig. 6. Rescue of HBVX- transcription by HBx correlates with the increase of active chromatin marks and with the decrease of both repressive marks and HP1 recruitment on the cccDNA. (A and B) dHepaRG cells were infected at MOI of 100 vp/cell with HBVwt or HBVX-. Seven days later, infected cells were transduced with a control lentiviral vector (TRIP Mock) or a lentiviral vector encoding HA-tagged HBx (TRIP HBx). Four days after transduction (A) HBV transcription was analyzed by RT-qPCR. Transcript level in cells transduced with TRIP Mock was set to 1. HA-HBx expression was analyzed by Western blot with anti-HA antibodies. (B) Histone modifications and HP1γ recruitment were analyzed by ChIP-qPCR using the indicated antibodies. (C and D) dHepaRG TRX cells were infected at MOI of 100 vp/cell with HBVX-. Seven days later infected cells were treated or not with doxycycline to induced HBx expression. Four days later (C) HBV transcription was analyzed by RT-qPCR. Transcript level in non-treated cells was set to 1. The expression of V5-tagged HBx was analyzed by immunoblot with anti-V5 antibodies. (D) Histone modifications were analyzed by ChIP using the indicated antibodies. (A–D) Mean ± SEM of at least three experiments are shown. *p* values were determined by Student's *t* test (*, $p < 0.05$).

Discussion

In this study, we explored the relationship between chromatin structure and transcription of the HBV cccDNA at early steps of HBV infection in primary hepatocytes and permissive cells infected with HBVwt and HBVX-. We confirmed that HBV transcription is repressed in the absence of HBx. This repression was characterized by a more compact structure of cccDNA as evidenced by lower sensitivity of HBVX- cccDNA to MNase digestion. We also observed that, upon infection of hepatocytes with HBVX-, histones are deacetylated and repressive chromatin marks (H3K9me3 and H3K9me2) are deposited on the viral DNA together with the silencing protein HP1, a pattern that is typical of cellular heterochromatin. In contrast, HBx expression was associated with the presence of epigenetic marks typical of transcriptionally active chromatin, such as H3 acetylation, H3K4me3 and H3K79me3. The repressive chromatin marks on HBVX- cccDNA could be reverted one week after infection by the re-expression of HBx *in trans*. Using shRNAs against cellular histone methyltransferases, we found that SETDB1 was involved in cccDNA silencing in the absence of HBx expression. We

Research Article

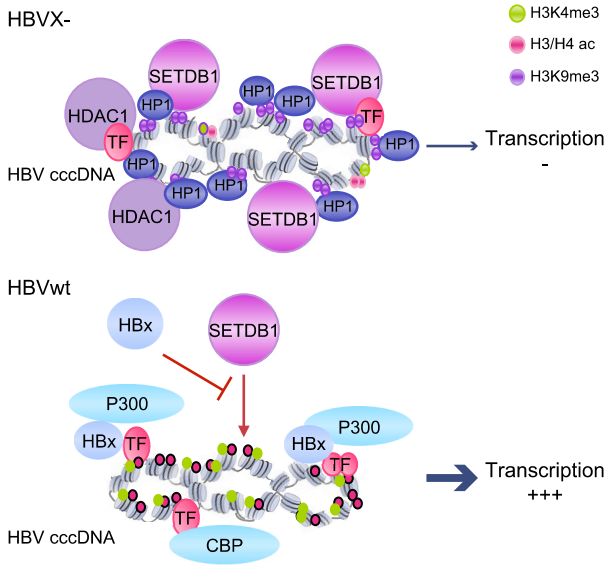


Fig. 7. A proposed model for the involvement of chromatin structure via the recruitment of chromatin modifying enzymes in the regulation of HBV cccDNA transcription.

therefore propose a model of HBV transcriptional activation in which HBx recruitment to the HBV mini-chromosome serves to counteract chromatin-mediated transcriptional repression established in part by SETDB1, HP1 and H3K9me3 (Fig. 7).

H3K9me3 has been associated with the establishment of a repressive chromatin structure and transcriptional silencing of different viral DNAs, including endogenous retrovirus (ERVs) in mouse embryonic stem cells (mESCs), human cytomegalovirus (hCMV) and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). This transcriptional repression can be mediated through the recruitment of either SETDB1 by the corepressor KRAB-associated protein1 (KAP1) in the case of ERVs or by Suv39H1 for HIV-1 transcriptional silencing [16,28,29]. We observed that repression of HBVX- transcription correlates with the concomitant increase of H3K9me3 and decrease of acH3 while its transcriptional reactivation by HBx is associated with an increase of activating marks and the decrease of H3K9me. We showed that knockdown of SETDB1 increases HBVX- transcription, which is associated with the decrease of H3K9me3 on cccDNA. The increase of HBVX- transcription upon SETDB1 depletion is however lower (1.65-fold, Fig. 4C) than the reactivation obtained upon HBx re-expression (3-fold, Fig. 6A). This observation could be explained by the fact that depletion of SETDB1 does not lead to the concomitant increase of acH3 with decrease of H3K9me3. For instance, SETDB1 depletion may not be efficient enough such that the residual deposition of H3K9me3 on HBV X- cccDNA would preclude H3K4 methylation on the same histone and subsequent recruitment of histone acetyltransferase, thus maintaining transcriptional repression. Alternatively, independent regulations involving post-translational modification on different sets of H3 molecules (i.e. H3 deacetylation and H3K9me3) may take place on the cccDNA and act together in HBVX- repression. It has been shown that depletion of Lsh, a member of the SNF2 family of chromatin remodeling proteins, leads to the increase of H3 acetylation and H3K4me3 without affecting H3K9me3 and HP1 recruitment on repetitive elements [30]. Finally, the role of H3K9me3 in HBV repression is further supported by our finding of increased recruitment of the three HP1 isoforms (HP1 α, β and γ) on the HBVX- cccDNA. HP1 proteins were first identified as critical components involved in heterochromatin gene silencing [31]. Our results suggest that all HP1 isoforms might participate in cccDNA silencing. However, overexpression of an HP1βΔN dominant-negative mutant did not significantly rescue HBVX- transcription. This might be due to the residual HP1 proteins that are still able to form functional dimers [27]. Alternatively, as mentioned before, cooperative mechanisms may be involved in HBV transcriptional repression.

Our study suggests that SETDB1 plays an important role in HBVX- silencing, but we cannot exclude that other KMTases are also involved. We observed that depletion of Suv39H1 slightly decreased H3K9me3 on HBVX- cccDNA. Interestingly SETDB1 has been previously shown to be part of a multimeric complex containing Suv39H1, the methyltransferase G9a and GLP [32]. Further studies will be needed to determine whether additional Suv3–9 members of the SET domain-containing protein family that catalyze H3K9me are involved in HBV repression. Moreover, SETDB1 is involved with KAP1 in the establishment of ERVs DNA methylation [33]. Since HBV cccDNA transcription has been shown to be regulated by DNA methylation, it will be interesting to determine whether methylation of the HBVX- cccDNA is increased compared to that of the HBVwt cccDNA and whether SETDB1 is involved in this process [34,35].

Using ChIP experiments we observed that HBVX- cccDNA was loaded with much less core protein than HBVwt cccDNA. Core protein has been shown to be important for HBV cccDNA chromatin organization, but its role in HBV transcription remains unclear [25,36]. The core protein can activate transcription of HBV preCore promoter by enhancing the binding of nuclear factor κ-B (NF-κB) upstream of the enhancer II region [37]. Recently, Guo and colleagues showed that HBc could also modulate cccDNA methylation through binding to CpG Island 2, thus favoring the maintenance of a permissive epigenetic state. We found here that a virus deficient for the expression of the core protein is transcribed, at least during the first days after infection, suggesting that the core protein is not essential for the initiation of HBV transcription. Moreover, we observed that the re-expression of HBx was sufficient to re-initiate and allow the transcription of HBVX- cccDNA. Overall our data suggest that the core protein is not necessary for the initiation of cccDNA transcription, while it cannot be ruled out that the core protein plays a role in the long-term maintenance of HBV transcription. Further studies are needed to fully characterize the involvement of DNA methylation in HBV transcription.

We confirmed in our study that HBx is essential for the transcription of the cccDNA and, using actinomycin D, we established that HBx acts at the level of transcription rather than on RNA stability. HBx was able to reactivate HBV transcription after the establishment of transcriptional repression and this correlated with the establishment of fully transcriptionally active chromatin. An important question is therefore to determine whether HBx activates transcription through the recruitment of activating factors or through the inhibition of repressor factors, or both. Indeed, HBx increases the recruitment of coactivators such as CBP/p300 and PCAF to targeted promoters, leading to the activation of gene expression in part through histone acetylation [4,12]. On the other

hand, it has been suggested that HBx is needed during infection to counteract a cellular repressive response that takes place after the start of viral transcription [11]. Interestingly, once entering the nucleus, viral DNA can be rapidly silenced through the establishment of repressed chromatin by cellular factors [24,38–42]. Viruses encode proteins able to counteract such response as a way to overcome this intrinsic antiviral defense. For instance the repressive activity of hDaxx or of alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked (ATRX) are respectively counteracted by hCMV tegument protein pp71 and E1B-55k/E4orf6 E3 ubiquitin ligase complex encoded by adenovirus type 5 [40,41]. An attractive model is therefore that HBx could target cellular factor(s) involved in cccDNA transcriptional repression. More studies are warranted to uncover the cellular factor(s) inducing HBV silencing and how HBx counteracts their activity. Recently we showed that the cellular protein Spindlin1 is involved in HBV transcriptional silencing [23]. It will be interesting to determine whether Spindlin1 is responsible for the recruitment of SETDB1 and for the establishment of repressed chromatin.

Financial support

This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche sur le Sida et les Hépatites Virales (ANRS). L.R. was supported by the Institut National du Cancer (INCa) and by ANRS, A.D. and L.G. were supported by ANRS. Liver samples were obtained from Pr M Riviere (CLB, Lyon, France), L Lefrançois and M Michelet (CRCL, Lyon) with the financial support of CLARA (Lyon).

Conflict of interest

The authors who have taken part in this study declared that they do not have any conflict of interest with respect to this manuscript.

Author contributions

LR, CN and OH designed the study and analyzed the data. LR, CN and MAB wrote the manuscript. LR performed the experiments, with help from AD. LG performed PHH infection and Southern and MNase digestion experiments. QD, SD and MLM contributed reagents and materials. All authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We thank E. Meurs for critical reading of the manuscript. We thank P.D. Adams, U. Protzer, C. Seeger, C. Sureau, C. Trepo and S. Urban for providing cell lines, plasmids and reagents used in this study.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2015.06.023.

References

Author names in bold designate shared co-first authorship

[1] Iavarone M, Colombo M. HBV infection and hepatocellular carcinoma. Clin Liver Dis 2013;17:375–397.
[2] Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. Gastroenterology 2009;137:e1591–e1592.
[3] Newbold JE, Xin H, Tencza M, Sherman G, Dean J, Bowden S, et al. The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes. J Virol 1995;69:3350–3357.
[4] Belloni L, Pollicino T, De Nicola F, Guerrieri F, Raffa G, Fanciulli M, et al. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106:19975–19979.
[5] Pollicino T, Belloni L, Raffa G, Pediconi N, Squadrito G, Raimondo G, et al. Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones. Gastroenterology 2006;130:823–837.
[6] Cougot D, Allemand E, Riviere L, Benhenda S, Duroure K, Levillayer F, et al. Inhibition of PP1 phosphatase activity by HBx: a mechanism for the activation of hepatitis B virus transcription. Sci Signal 2012;5, ra1.
[7] Belloni L, Allweiss L, Guerrieri F, Pediconi N, Volz T, Pollicino T, et al. IFN-alpha inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome. J Clin Invest 2012;122:529–537.
[8] Keasler VV, Hodgson AJ, Madden CR, Slagle BL. Enhancement of hepatitis B virus replication by the regulatory X protein in vitro and in vivo. J Virol 2007;81:2656–2662.
[9] **Leupin O**, **Bontron S**, Schaeffer C, Strubin M. Hepatitis B virus X protein stimulates viral genome replication via a DDB1-dependent pathway distinct from that leading to cell death. J Virol 2005;79:4238–4245.
[10] Tang H, Delgermaa L, Huang F, Oishi N, Liu L, He F, et al. The transcriptional transactivation function of HBx protein is important for its augmentation role in hepatitis B virus replication. J Virol 2005;79:5548–5556.
[11] **Lucifora J**, **Arzberger S**, Durantel D, Belloni L, Strubin M, Levrero M, et al. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. J Hepatol 2011.
[12] Cougot D, Wu Y, Cairo S, Caramel J, Renard CA, Levy L, et al. The hepatitis B virus X protein functionally interacts with CREB-binding protein/p300 in the regulation of CREB-mediated transcription. J Biol Chem 2007;282:4277–4287.
[13] Benhenda S, Ducroux A, Riviere L, Sobhian B, Ward M, Dion S, et al. The PRMT1 methyltransferase is a binding partner of HBx and a negative regulator of hepatitis B virus transcription. J Virol 2013.
[14] Wang H, An W, Cao R, Xia L, Erdjument-Bromage H, Chatton B, et al. MAM facilitates conversion by ESET of dimethyl to trimethyl lysine 9 of histone H3 to cause transcriptional repression. Mol Cell 2003;12:475–487.
[15] Binda O. On your histone mark, SET, methylate! Epigenetics 2013;8:457–463.
[16] Leung DC, Lorincz MC. Silencing of endogenous retroviruses: when and why do histone marks predominate? Trends Biochem Sci 2011;37:127–133.
[17] Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. Cell Res 2011;21:381–395.
[18] **Bannister AJ**, **Zegerman P**, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, et al. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. Nature 2001;410:120–124.
[19] Schultz DC, Ayyanathan K, Negorev D, Maul GG, Rauscher 3rd FJ. SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. Genes Dev 2002;16:919–932.
[20] Verschure PJ, van der Kraan I, de Leeuw W, van der Vlag J, Carpenter AE, Belmont AS, et al. In vivo HP1 targeting causes large-scale chromatin condensation and enhanced histone lysine methylation. Mol Cell Biol 2005;25:4552–4564.
[21] Maison C, Almouzni G. HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. Nat Rev 2004;5:296–304.
[22] Deng Q, Mancini-Bourgine M, Zhang X, Cumont MC, Zhu R, Lone YC, et al. Hepatitis B virus as a gene delivery vector activating foreign antigenic T cell response that abrogates viral expression in mouse models. Hepatology 2009;50:1380–1391.
[23] Ducroux A, Benhenda S, Riviere L, Semmes OJ, Benkirane M, Neuveut C. The tudor domain protein spindlin1 is involved in intrinsic antiviral defense

Research Article

against incoming hepatitis B virus and herpes simplex virus type 1. PLoS Pathog 2014;10:e1004343.
[24] Knipe DM, Cliffe A. Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. Nat Rev Microbiol 2008;6:211–221.
[25] Bock CT, Schwinn S, Locarnini S, Fyfe J, Manns MP, Trautwein C, et al. Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome. J Mol Biol 2001;307:183–196.
[26] **Pokholok DK**, **Harbison CT**, Levine S, Cole M, Hannett NM, Lee TI, et al. Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. Cell 2005;122:517–527.
[27] Zhang R, Liu ST, Chen W, Bonner M, Pehrson J, Yen TJ, et al. HP1 proteins are essential for a dynamic nuclear response that rescues the function of perturbed heterochromatin in primary human cells. Mol Cell Biol 2007;27:949–962.
[28] Rowe HM, Trono D. Dynamic control of endogenous retroviruses during development. Virology 2011;411:273–287.
[29] du Chene I, Basyuk E, Lin YL, Triboulet R, Knezevich A, Chable-Bessia C, et al. Suv39H1 and HP1gamma are responsible for chromatin-mediated HIV-1 transcriptional silencing and post-integration latency. EMBO J 2007;26:424–435.
[30] **Yan Q**, **Huang J**, Fan T, Zhu H, Muegge K. Lsh, a modulator of CpG methylation, is crucial for normal histone methylation. EMBO J 2003;22:5154–5162.
[31] Canzio D, Larson A, Narlikar GJ. Mechanisms of functional promiscuity by HP1 proteins. Trends Cell Biol 2014;24:377–386.
[32] Fritsch L, Robin P, Mathieu JR, Souidi M, Hinaux H, Rougeulle C, et al. A subset of the histone H3 lysine 9 methyltransferases Suv39h1, G9a, GLP, and SETDB1 participate in a multimeric complex. Mol Cell 2010;37:46–56.
[33] Rowe HM, Friedli M, Offner S, Verp S, Mesnard D, Marquis J, et al. De novo DNA methylation of endogenous retroviruses is shaped by KRAB-ZFPs/KAP1 and ESET. Development 2013;140:519–529.
[34] Guo Y, Li Y, Mu S, Zhang J, Yan Z. Evidence that methylation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in liver tissues of patients with chronic hepatitis B modulates HBV replication. J Med Virol 2009;81:1177–1183.
[35] Vivekanandan P, Thomas D, Torbenson M. Methylation regulates hepatitis B viral protein expression. J Infect Dis 2009;199:1286–1291.
[36] Bock CT, Schranz P, Schroder CH, Zentgraf H. Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell. Virus Genes 1994;8:215–229.
[37] Kwon JA, Rho HM. Hepatitis B viral core protein activates the hepatitis B viral enhancer II/pregenomic promoter through the nuclear factor kappaB binding site. Biochem Cell Biol 2002;80:445–455.
[38] Gu H, Roizman B. Engagement of the lysine-specific demethylase/HDAC1/CoREST/REST complex by herpes simplex virus 1. J Virol 2009;83:4376–4385.
[39] Lieberman PM. Chromatin organization and virus gene expression. J Cell Physiol 2008;216:295–302.
[40] Schreiner S, Burck C, Glass M, Groitl P, Wimmer P, Kinkley S, et al. Control of human adenovirus type 5 gene expression by cellular Daxx/ATRX chromatin-associated complexes. Nucleic Acids Res 2013;41:3532–3550.
[41] Tavalai N, Stamminger T. Intrinsic cellular defense mechanisms targeting human cytomegalovirus. Virus Res 2011;157:128–133.
[42] Woodhall DL, Groves IJ, Reeves MB, Wilkinson G, Sinclair JH. Human Daxx-mediated repression of human cytomegalovirus gene expression correlates with a repressive chromatin structure around the major immediate early promoter. J Biol Chem 2006;281:37652–37660.

VI.4. Discussion de l'étude 1

Dans un modèle d'infection naturelle *in vitro*, les PHH et les HepaRG, cette étude confirme les études précédentes à propos des mécanismes de régulation de l'ADNccc [62]. Dans un contexte d'infection, HBx affecte la compaction de l'ADN et module la transcription de l'ADN viral.

Les histones cellulaires s'associent à l'ADN viral pour former un minichromosome. Ces histones sont soumises aux mêmes modifications épigénétiques que la chromatine cellulaire et permettent la régulation de la transcription de l'ADNccc. En l'absence de la protéine HBx, l'ADNccc est inactif d'un point de vue transcriptionnel et l'on retrouve des marques de transcription inactive sur ses histones. De plus, ces travaux apportent l'évidence que HBx est impliquée dans l'inhibition la restriction de la transcription de l'ADNccc médiée par la méthyltransférase SETDB1.

A la suite de nos travaux, l'étude de l'équipe de Tropberger et al. a permis, par une approche de ChIP-Seq, de cartographier les modifications post-traductionnelles (PTM) présentes sur l'ADNccc [58]. Ils ont observé, dans trois contextes d'infections différents (infection de cellules HepG2-NTCP, d'hépatocytes primaires humains (PHH) et des biopsies de foies infectés) des taux importants des modifications H3K4me3, H3K27ac et H3K122ac enrichies au niveau des séquences promotrices de l'ADN viral. Il est d'ailleurs connu que, sur la chromatine cellulaire, H3K4me3 et H3k27ac sont présents au niveau des promoteurs et stimulent la transcription en recrutant des partenaires protéiques activant la transcription. La répartition des PTMs sur l'ADNccc est organisée et prouve que les histones subissent ces modifications après leur liaison avec l'ADN viral à la manière des histones présentes sur le génome cellulaire.

La triméthylation de la lysine K27 de l'histone H3 fait partie des marques répressives les plus connues et indique les gènes dont la transcription est réprimée. Etrangement peu de ces marques ont été observées dans cette étude. [58] La régulation négative de l'ADN viral pourrait être modulée d'une autre façon, par la méthylation de l'ADN au niveau des îlots CpG par exemple, ou comme nous l'indique les résultats de cette étude 1 une compaction importante de l'ADNccc.

L'ADNccc semble exister dans les cellules sous des formes plus ou moins compactées. On peut imaginer que l'environnement cellulaire joue un rôle sur cet équilibre dynamique. La forme la plus compactée pourrait correspondre à une forme plus stable et plus résistante qui serait transmise aux cellules filles lors de la division cellulaire afin de maintenir l'ADN viral dans le foie pendant très longtemps. Cette forme plus compactée serait transcriptionnellement inactive permettant à ce virus silencieux d'échapper à la réponse immune, pour ensuite se réactiver dans des conditions favorables par de simples modifications épigénétiques.

De nombreuses questions restent en suspens à la fin de cette étude et mériteraient d'être étudiées dans de futurs projets : quels sont les mécanismes cellulaires impliqués dans la reconnaissance de l'ADNccc ? Par quel mécanisme SETDB1 est-elle recrutée sur l'ADNccc et inhibée en présence d'HBx ; HBx cible-t-elle directement SETDB1, ou un de ses partenaires, ou agit-elle sur des facteurs situés plus en amont et responsables de la détection de l'ADN viral et de sa répression transcriptionnelle ? Et enfin, y a-t-il un lien entre ces modifications topologiques et épigénétiques de l'ADNccc et la dégradation de SMC5/6 via HBx présentée dans l'étude 2 de ce manuscrit ?

VII. Travaux 2 : Identification de SMC5/6 en tant que facteur de restriction dégradé par HBx

Plan

VII. Travaux 2 : Identification de SMC5/6 en tant que facteur de restriction dégradé par HBx 142
VII.1. Introduction 142
VII.1.1. Interaction entre les virus et les mécanismes d'ubiquitination 142
VII.1.2. Nos travaux 148
VII.2. Article 149
VII.3. Discussion étude 2 172
VII.3.1. Description du complexe SMC5/6 174
VII.3.2. SMC5/6, facteur de restriction ? 178
VII.3.3. Mécanismes mis en jeu lors de l'inhibition par SMC5/6 186
VII.3.4. Conséquences cellulaires de la dégradation de SMC5/6 190

VII.1. Introduction de l'étude 2

VII.1.1. Interaction entre les virus et les mécanismes d'ubiquitination

L'interaction entre HBx et DDB1 est l'une des interactions de HBx la plus décrite et la plus conservée dans les *Hepadnavirus* de mammifères. Comme décrit précédemment, la protéine DDB1 est connue pour son rôle dans les mécanismes de réparation de l'ADN mais aussi comme facteur de l'ubiquitination de protéine. On sait que HBx interagit avec DDB1 au sein d'un complexe Cul4/DDB1 à l'activité ubiquitine ligase. Néanmoins la ou les cibles spécifiques de ce complexe étaient jusqu'à présent inconnues.

La dégradation des protéines via l'ubiquitination et le protéasome est appelée le système UPS (ubiquitine protease system), c'est un mécanisme très conservé qui permet la régulation du taux de protéines cellulaires impliquées dans différents processus.
En dehors de HBV, de nombreux virus détournent ce système UPS pour contrer les mécanismes de défenses de la cellule ou pour aider leurs propres réplications.

VII.1.1.a. Le système UPS

Le système UPS (Ubiquitine Protease System) est un système très conservé qui permet la liaison covalente d'ubiquitines (Ub - 76aa) sur des protéines. C'est un mécanisme impliqué

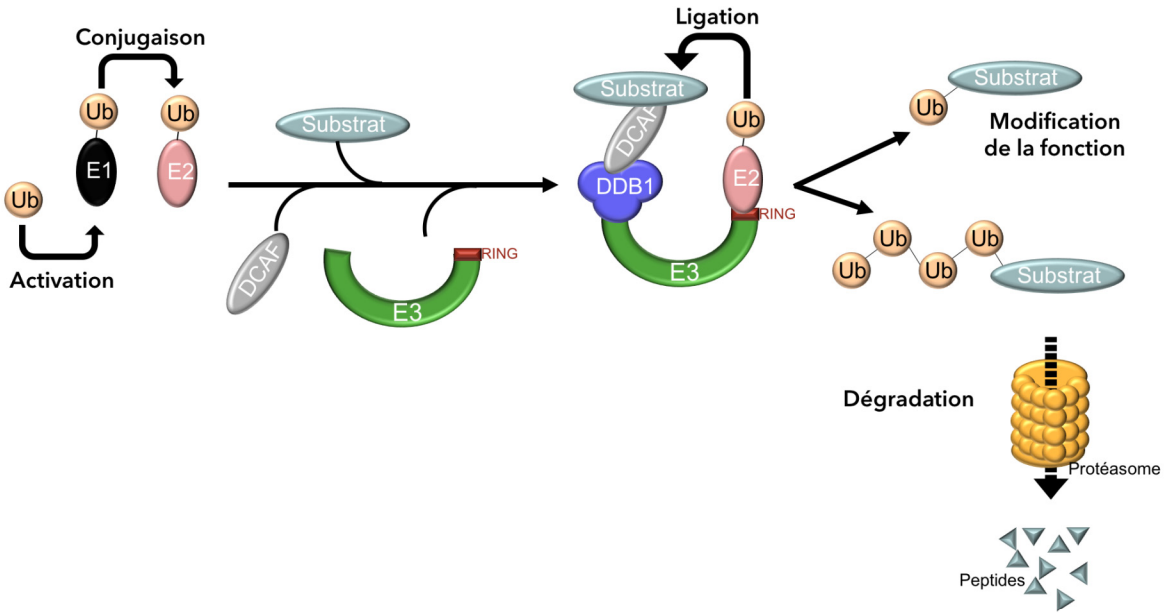


Figure 35 **Etapes de l'ubiquitination d'une protéine via le complexe CUL4A/DDB1**

Activation : L'enzyme E1 active l'Ub par un mécanisme ATP dépendant et la fixe par une liaison thioester.
Conjugaison : L'Ub est transférée sur l'enzyme E2 toujours via une liaison thioester.
Ligation : L'enzyme E3 (ou CRL) est composée par la Cullin 4A et une protéine RING, elle s'associe avec DDB1 et une protéine DCAF pour permettre le recrutement de substrats spécifiques et leurs ubiquitinations.
Une monoubiquitination induit une modification de la protéine alors que la polyubiquitination conduit à la dégradation du substrat via le protéasome.

dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la régulation du cycle, l'apoptose, la régulation de la transcription, le remodelage de la chromatine, les mécanismes de réparation de l'ADN et le contrôle qualité des protéines.
L'ubiquitination conduit à une modification de la fonction de la protéine (dans le cas d'une monoubiquitination) ou à une dégradation de celle-ci via le protéasome (pour les protéines polyubiquitinées).

La modification covalente qui permet l'ajout d'Ub est induite via une cascade enzymatique incluant une enzyme activant Ub (E1 - ub-activating), une enzyme permettant la conjugaison de Ub (E2 - Ub-conjugating) et une enzyme permettant la liaison de Ub (E3 - Ub ligase), via le recrutement de substrat et son ubiquitination. (FIGURE 35)
Chez l'homme on retrouve seulement un gène codant pour E1, environ 40 gènes codant pour une enzyme E2 et plus d'une centaine de gènes pour les E3, ceci confère le grand panel d'action au système UPS.

Parmi les E3 ubiquitine ligase, les plus majoritaires (environ 95%) sont les Cullin-RING-ligase (CRLs). La CRL4 est formée par un échafaudage des Cullins CUL4 (CUL4A ou CUL4B, à 83% identiques, elles ont des fonctions redondantes), de la protéine DDB1 agissant comme un adaptateur à l'extrémité N-terminale de CUL4 et du coté C-terminal d'une protéine RING (Really Interesting New Gene).
Une des fonctions de DDB1 est d'être une protéine adaptatrice du complexe CRL4. DDB1 recrute des partenaires DCAFs (DDB1 Cullin Accesory Protein) dans le but de lier les substrats du complexe pour induire leur ubiquitination. Il existe environ 79 DCAFs cellulaires connus et partageant les mêmes propriétés biophysiques.

Les CRLs sont régulées via la neddylation (NEDD8- neural precursor cell-expressent developmentally downregulated protein 8), protéine proche à 76% des ubiquitines, nécessaire à leur activité.
Le dernier acteur du système UPS est le protéasome, retrouvé dans le noyau et le cytoplasme il reconnaît les protéines cibles polyubiquitinées et via l'action enzymatique de ses composants permet la dégradation des protéines.

Il est important de noter que, de par son implication importante dans de très nombreuses activités cellulaires, l'altération du système UPS favorise grandement le développement des cancers. La surexpression du gène *Cul4A* est retrouvée dans plusieurs cancers, dont celui du foie. De plus, une corrélation existe entre forte expression de CUL4A et mauvaise survie des patients, voir accélération du processus néoplasique dans les tumeurs de l'ovaire et certains cancers du sein, suggérant que CUL4A pourrait promouvoir la carcinogénèse.

Viser l'activité de ces protéines pourrait constituer de nouvelles cibles thérapeutiques. Le protéasome est déjà utilisé comme cible de certains traitements anticancéreux, en effet les cellules ayant une division très rapide sont plus sensibles à une inhibition du protéasome que les cellules non cancéreuses [96]. L'inconvénient majeur de ces traitements repose sur leur toxicité très importante. Il sera important dans le futur de développer des molécules plus spécifiques.
Une famille de molécules testées pour inhiber l'activité des CRLs repose sur le blocage de la neddylation. Par exemple le MLN4924, permet l'inhibition de la neddylation de l'enzyme E1 de

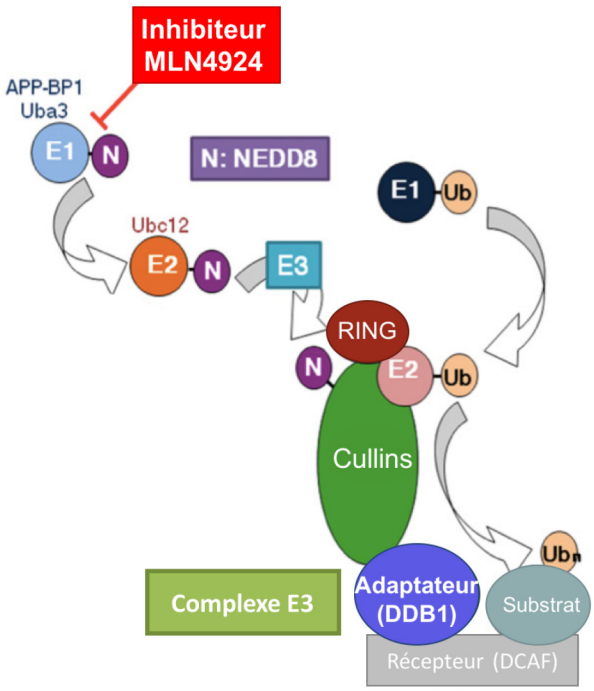


Figure 36 **Schématisation de la cascade de neddylation**

Cascade de signalisation conduisant à la neddylation du complexe E3 ubiquitine ligase et permettant l'ubiquitination des protéines cibles. Le MLN 4924 est un inhibiteur de la neddylation qui cible l'enzyme E1 de la cascade de neddylation. N= NEDD ; Ub= Ubiquitine ; Ub= polyubiquitination ; RING= domaine de la protéine Cullin permettant l'interaction avec l'enzyme E2.
Figure adaptée de [231]

Tableau 6 **Protéines virales interagissant avec le complexe CUL4-DDB1-E3 ubiquitine ligase**

Adapté de [96]

Famille virale	Virus	Protéines	Voies cellulaires altérées
Paramyxovirus	SV5 - Virus Simien 5	V	Immunité innée
	HPIV2	V	Immunité innée
	Mumps	V	Immunité innée
Hepadnavirus	HBV	HBx	Inconnue
Rétrovirus	HIV-1	Vpr	Cycle cellulaire
	HIV-2	Vpx	Cycle cellulaire
Flavivirus	HCV	NS3/4A	Inconnue
Herpesvirus	MHV-68	M2	Apoptose
	EBV	BPLF1	Cycle cellulaire
	BHV-1	VP8	Inconnue

la cascade de neddylation. Cependant, en ciblant l'enzyme E1 c'est toutes les cascades de signalisation de l'ubiquitination qui vont être inhibées engendrant un effet cytotoxique très important dans les cellules [231]. (FIGURE 36)

VII.1.1.b. De nombreux virus modulent le système UPS

La quasi-totalité des virus affectent ou exploitent le système UPS via l'ubiquitination ou la désubiquitination de facteurs au niveau de différentes phases de leur cycle réplicatif. Ainsi de nombreux traitements ont été basés sur le blocage du système UPS (inhibition du protéasome ou diminution du pool d'Ub). L'utilisation d'inhibiteur du protéasome interfère avec la réplication de la plupart des virus pathogènes humains (*herpesvirus, poxvirus, hepadnavirus, adenovirus, influenzavirus, retrovirus, coronavirus, paramyxovirus, picornavirus* ou *rotavirus*) [232].

L'ubiquitination peut jouer un rôle au niveau de différentes étapes de la réplication virale :

- Au niveau de l'entrée dans la cellule et les premières étapes de réplication. C'est le cas pour HSV ou KSHV par exemple.
- Au niveau de la régulation des gènes viraux pour EBV ou HIV-1 par exemple
- Pour maintenir la phase de latence de certains virus comme EBV ou KSHV. [232]

Certains virus codent pour des protéines régulatrices et sont capables de cibler le complexe DDB1 et CRL4. (TABLEAU 6)

De façon à limiter les effets de l'immunité innée sur l'infection, certains virus ont développé des stratégies pour inhiber cette réponse immunitaire. C'est le cas du virus SV5, dont la protéine V est capable d'interagir avec DDB1 [233] pour recruter et dégrader le facteur de transcription STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1) activé par la voie de l'interféron [234]. De la même manière, la protéine V de HPIV2 cible et dégrade STAT2 [235].

Le détournement du système UPS est aussi présent chez HIV2, en effet la protéine Vpx est capable de dégrader le facteur de restriction SAMDH1 via le recrutement du complexe DDB1-E3 ubiquitine ligase [236].

Pour favoriser la réplication des virus, le détournement du système UPS peut aussi être utilisé. Par exemple, chez HIV1, la protéine Vpr se lie au complexe CUL4-DDB1 et conduit à un arrêt du cycle cellulaire en phase G2 en provoquant des modifications épigénétiques au niveau de l'hétérochromatine cellulaire.

D'une façon différente, le virus de l'Herpès Simplex (HSV) utilise sa propre protéine ICP0, ayant une activité ubiquitine ligase, pour dégrader les PML séquestrant le virus [237].

VII.1.1.c. Interaction de HBx et le système UPS

Comme nous avons pu le voir dans les chapitres précédents, HBV et plus particulièrement HBx est capable d'interagir avec ce système notamment via son interaction avec DDB1 [122].

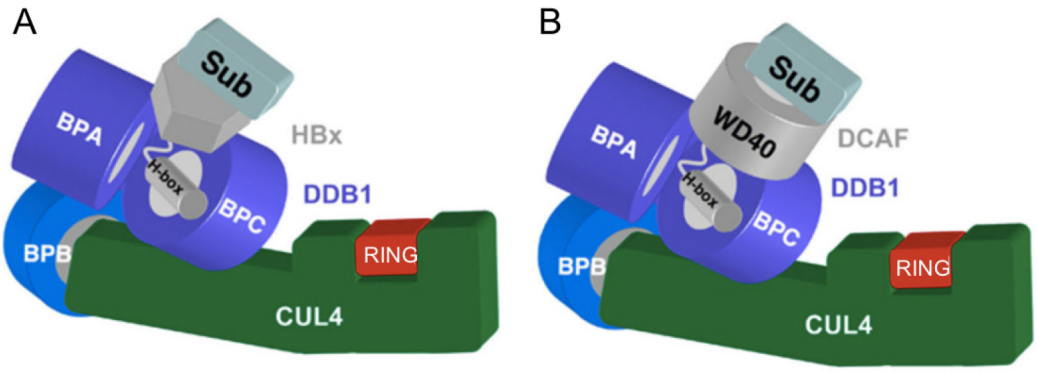


Figure 37 L'association entre le complexe DDB1/E3 ubiquitine ligase et HBx est similaire de celle avec les protéines DCAFs

Schématisation de l'assemblage entre la E3 ubiquitine ligase, DDB1 et HBx (A) ou une protéine de la famille DCAF (B). En vert et rouge le complexe E3 ubiquitine ligase (CUL4) avec le domaine RING nécessaire à l'interaction avec l'enzyme E2 qui porte l'ubiquitine. En bleu la protéine DDB1 avec ses 3 domaines structuraux, BPB permet l'interaction avec CUL4, BPA et BPC forme une poche pour accueillir le domaine H-Box d'une protéine DCAF ou HBx. En gris, HBx ou DCAF avec leur motif WD40 permettant le recrutement les substrats (Sub) cible de l'ubiquitination.
Figure adaptée de [238]

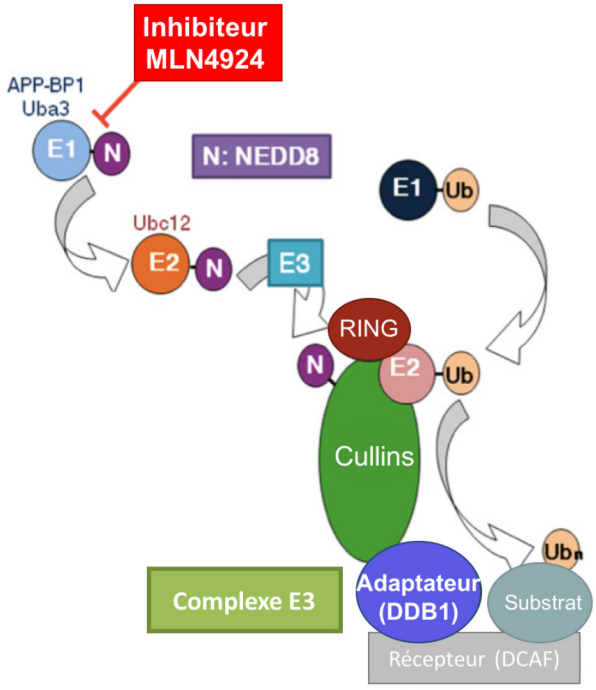


Figure 36 Schématisation de la cascade de neddylation

Cascade de signalisation conduisant à la neddylation du complexe E3 ubiquitine ligase et permettant l'ubiquitination des protéines cibles. Le MLN 4924 est un inhibiteur de la neddylation qui cible l'enzyme E1 de la cascade de neddylation. N= NEDD ; Ub= Ubiquitine ; Ub= polyubiquitination ; RING= domaine de la protéine Cullin permettant l'interaction avec l'enzyme E2. Figure adaptée de [231]

Dans le complexe DDB1/HBx, la protéine virale agit comme les protéines DCAFs, plateforme nécessaire au recrutement des protéines cibles. En effet, HBx contient un motif de 16 aa (H-box) retrouvé dans les 79 DCAF qui interagissent avec DDB1 au niveau du même site de liaison [96]. (FIGURE 37)

L'interaction entre HBx et DDB1 est donc impliquée dans le recrutement de substrats qui pourront être ubiquitinés par le système UPS. Cependant les protéines cibles de ce complexe n'avaient jusqu'à présent pas été identifiées.
Il est important de noter que l'interaction de HBx avec DDB1, empêche le recrutement des autres DCAFs, l'altération du système UPS ainsi opéré peut avoir diverses conséquences dans la cellule, au profit du virus ou de l'hépatocarcinogénèse.

D'autres études suggèrent une interaction de HBx au niveau des protéines impliquées dans la déneddylation, les CSN (CSN5 subunit of the COP9 signalosome) [239]. A l'image du virus EBV qui code pour une protéine avec une activité déneddylase utilisée pour créer un environnement proche de la phase S et nécessaire à la réplication du virus, on peut imaginer une fonction similaire de l'interaction entre HBx et CSN mais aucune étude n'a, pour le moment, déterminé le rôle de cette interaction [96].

VII.1.2. Nos travaux

L'équipe de Michel Strubin et la nôtre ont précédemment montré que l'interaction entre HBx et DDB1 au sein de ce complexe était déterminante pour la transactivation du génome viral sous forme plasmidique et que de cette régulation n'était pas limitée aux promoteurs de HBV [77]. Cependant les mécanismes mis en jeu et notamment la ou les protéines cibles du complexe HBx/DDB1/E3 ubiquitine ligase était inconnues.

L'identification de cette cible a fait l'objet d'un casse-tête technique car il était difficile de pouvoir identifier une protéine interagissant avec un complexe qui induit sa dégradation dès son association avec celui-ci. C'est pourquoi, la mise ne place d'une stratégie consistant à maintenir la protéine cible associée au complexe HBx/DDB1 a été élaborée. Pour cela une liaison covalente entre HBx et une protéine DDB1 mutée au niveau de son site de fixation à l'enzyme E3 a permis de recruter les protéines cibles tout en empêchant leur ubiquitination. L'analyse par spectrométrie de masse a permis d'identifier les protéines ciblées. De façon remarquable, les 6 protéines composant le complexe SMC5/6 (structural maintenance of chromosomes proteins 5/6) ont été retrouvées associées à la protéine de fusion HBx-DDB1 mutée. Nous avons ensuite démontré la dégradation du complexe SMC5/6 dans des hépatocytes primaires humains et des HepaRG infectés *in vitro* par le virus HBV WT. L'utilisation d'un virus muté pour l'expression de HBx associée à des expériences de ChIP montre qu'en l'absence de HBx SMC5/6 se fixe sur l'ADN épisomal du virus bloquant sa transcription. En provoquant sa dégradation, HBx active la transcription virale et permet la réplication de HBV. Nous avons confirmé que cette dégradation implique DDB1 par l'utilisation de siARN (small interfering RNA) contre DDB1 et le complexe DDB1-E3 ubiquitine ligase par l'utilisation d'un inhibiteur de la première étape de la neddylation, le MLN4924. (FIGURE 36)
Ce phénomène n'est pas limité au HBV mais concerne tous les ADN épisomaux comme le suggéraient les travaux précédents [77]. Enfin, la dégradation de SMC6 par HBx, ou artificiellement par l'utilisation de shARN (small hairpin RNA) contre SMC6 provoque la destruction du complexe et restaure la transcription de cet ADN extra-chromosomique.

VII.2. Article

LETTER

doi:10.1038/nature17170

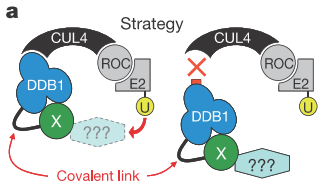
Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor

Adrien Decorsière[1]*, Henrik Mueller[1]†*, Pieter C. van Breugel[1]†*, Fabien Abdul[1]*, Laetitia Gerossier[2], Rudolf K. Beran[3], Christine M. Livingston[3], Congrong Niu[3], Simon P. Fletcher[3], Olivier Hantz[2] & Michel Strubin[1]

Chronic hepatitis B virus infection is a leading cause of cirrhosis and liver cancer[1,2]. Hepatitis B virus encodes the regulatory HBx protein whose primary role is to promote transcription of the viral genome, which persists as an extrachromosomal DNA circle in infected cells[3–5]. HBx accomplishes this task by an unusual mechanism, enhancing transcription only from extrachromosomal DNA templates[6]. Here we show that HBx achieves this by hijacking the cellular DDB1-containing E3 ubiquitin ligase to target the 'structural maintenance of chromosomes' (Smc) complex Smc5/6 for degradation. Blocking this event inhibits the stimulatory effect of HBx both on extrachromosomal reporter genes and on hepatitis B virus transcription. Conversely, silencing the Smc5/6 complex enhances extrachromosomal reporter gene transcription in the absence of HBx, restores replication of an HBx-deficient hepatitis B virus, and rescues wild-type hepatitis B virus in a DDB1-knockdown background. The Smc5/6 complex associates with extrachromosomal reporters and the hepatitis B virus genome, suggesting a direct mechanism of transcriptional inhibition. These results uncover a novel role for the Smc5/6 complex as a restriction factor selectively blocking extrachromosomal DNA transcription. By destroying this complex, HBx relieves the inhibition to allow productive hepatitis B virus gene expression.

HBx stimulates transcription of the hepatitis B virus (HBV) genome as well as of any reporter gene provided the DNA template remains extrachromosomal. When the template is integrated into the chromosome, the HBx effect is lost[4,6]. Previous studies suggested that this unusual property requires HBx to bind the DDB1 subunit of the DDB1-containing E3 ubiquitin ligase to target an unknown host cell factor for ubiquitin-mediated degradation[6–9]. To identify the HBx target(s), we employed a tandem affinity purification (TAP) strategy. As baits, we used wild-type HBx, a DDB1-binding-defective HBx(R96E) mutant[8], the woodchuck hepatitis virus HBx counterpart, WHx, that exhibits similar properties[8,10], and the unrelated paramyxovirus SV5-V protein. SV5-V binds DDB1 in a manner similar to HBx to target STAT1 for ubiquitin-mediated degradation[8,11,12]. DDB1 was the most abundant protein species co-purifying with all viral proteins, except the HBx(R96E) mutant (Extended Data Fig. 1a, b). Other components of the E3 ligase were also identified. This provides further evidence that HBx predominantly exists in association with the DDB1 E3 ligase complex[8,13,14]. However, no protein behaving as a potential HBx substrate was recovered. Similarly, STAT1 did not co-purify with SV5-V under these conditions (Extended Data Fig. 1b).

We therefore turned to an alternative strategy. We postulated that HBx may detectably interact with its substrate only when bound to DDB1 and when substrate ubiquitination is blocked. With this in mind, we took advantage of our previous finding that a covalent link between HBx and DDB1 forces interaction between the two proteins, thereby preventing HBx binding to endogenous DDB1[8,13]. We fused TAP-tagged HBx to wild-type DDB1 or to a DDB1 mutant that could not incorporate into the E3 ligase complex (Fig. 1a). The expectation was that fusion of HBx to the DDB1 mutant would prevent ubiquitination of the substrate and thereby stabilize the HBx–substrate interaction. A proof-of-principle experiment demonstrated that this did indeed occur with SV5-V and its target STAT1 (Extended Data Fig. 1c, d). Intriguingly, all six subunits of the Smc5/6 complex (Extended Data Fig. 1e), which plays a broad role in DNA repair and chromatin organization[15–17], were only recovered with the HBx–DDB1 mutant fusion (Fig. 1b and Supplementary Table 1). The selective recovery of this complex with the HBx–DDB1 mutant, and its lack of interaction with the corresponding SV5-V–DDB1 construct, was confirmed by co-immunoprecipitation experiments (Fig. 1c). Hence, the Smc5/6



b HBx–DDB1

HBx	WT Pep.	WT Cov. (%)	Mutant Pep.	Mutant Cov. (%)
HBx	2	18	3	28
DDB1 E3 ligase				
DDB1	39	38	34	35
DDA1	3	28	5	39
CUL4A	2	4	–	–
SMC complex				
Smc5	–	–	26	25
Smc6	–	–	17	22
Nse1	–	–	3	12
Nse2	–	–	7	23
Nse3	–	–	11	45
Nse4	–	–	2	6

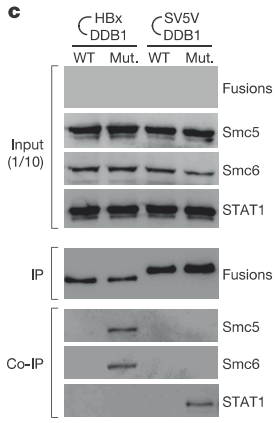


Figure 1 | Identification of the Smc5/6 complex as an HBx interacting partner. a, Strategy. See text for description. **b**, The HBx–DDB1 fusions and associated proteins were isolated by TAP and subjected to mass spectrometric analysis (see Methods). The number of unique peptides (Pep.) and percentage of total protein sequence covered (Cov. (%)) are indicated. Nse1–4 are subunits of the Smc5/6 complex. WT, wild type. **c**, HBx and SV5-V fused to the indicated DDB1 were purified from transfected HepG2 cells. The amount recovered (IP) and the presence of Smc5, Smc6 and STAT1 (Co-IP) were assessed by western blot. The fusion proteins were detected using anti-Flag antibodies; expression was too low for detection in crude extracts (input). For gel source data, see Supplementary Fig. 1.

[1]Department of Microbiology and Molecular Medicine, University Medical Centre (C.M.U.), Rue Michel-Servet 1, 1211 Geneva 4, Switzerland. [2]CRCL, INSERM U1052, CNRS 5286, Université de Lyon, 151, Cours A Thomas, 69424 Lyon Cedex, France. [3]Gilead Sciences, Inc., 333 Lakeside Drive, Foster City, California 94404, USA. †Present addresses: Roche Pharmaceutical Research & Early Development, Infectious Diseases Discovery & Translational Area, Roche Innovation Center Basel, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Grenzacherstrasse 124, 4070 Basel, Switzerland (H.M.); The Netherlands Cancer Institute, Division of Biological Stress Response, Plesmanlaan 121, 1066CX, Amsterdam, The Netherlands (P.C.v.B.).
*These authors contributed equally to this work.

© 2016 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

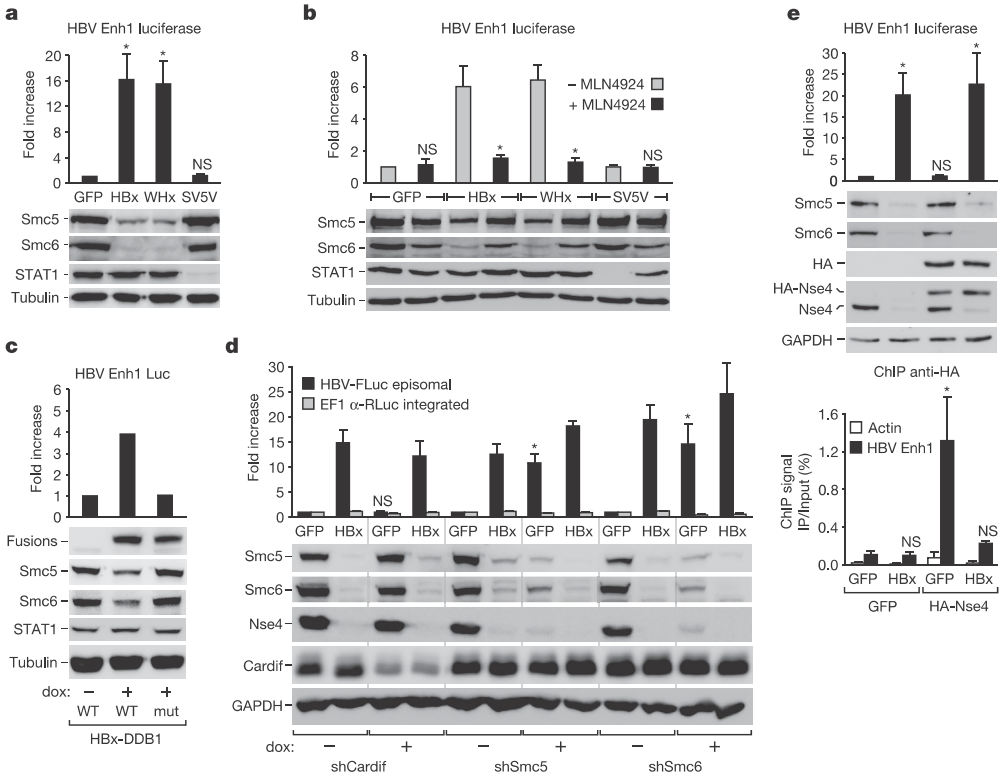


Figure 2 | HBx stimulates reporter gene activity by degrading Smc5/6 to prevent its binding to episomal DNA. a, HepG2 cells were transfected with a luciferase reporter gene driven by the HBV Enhancer I (Enh1) and then transduced with lentiviral vectors expressing green fluorescent protein (GFP) or the indicated GFP-tagged viral proteins. Luciferase assay and western blot were performed 6 days after transfection. Luciferase activity is relative to GFP, which was set to 1. $*P < 0.05$ by paired analysis of variance (ANOVA) relative to GFP control. NS, not significant ($P \geq 0.05$). **b**, Same as in **a** except cells were treated or not with 5 μM MLN4924 starting 6 h before transduction. Analysis was performed 3 days later. $*P < 0.05$ by *t*-test relative to matched no MLN4924 control. **c**, Same as in **a** but with cells expressing a doxycycline (dox)-inducible wild-type or mutant (mut) HBx–DDB1 fusion. Analysis performed as in **a**. See also Extended Data Fig. 2e. **d**, Activity of a transiently transfected (episomal) HBV Enh1-driven firefly reporter (HBV-FLuc) and a chromosomally integrated EF1α promoter-driven *Renilla* reporter (EF1α-RLuc) in HepG2 cells transduced with GFP or GFP–HBx and expressing (+) or not (−) the indicated doxycycline-inducible shRNA. Analysis performed after 6 days of culture. $*P < 0.05$ by *t*-test relative to matched HBV-FLuc episomal no doxycycline GFP control. **e**, Same as in **a** but with HepG2 cells co-transduced with GFP or an HA-tagged Nse4 subunit of the Smc5/6 complex together with GFP or GFP–HBx as indicated. Luciferase and western blot analyses performed 6 days later. In parallel, HA-Nse4 binding to the episomal reporter (filled bars) or the β-actin gene (open bars) was monitored by ChIP using anti-HA antibodies (bottom). Data expressed as percentage of input DNA recovered. Note the reduced binding of HA-Nse4 in the presence of HBx despite comparable expression levels, consistent with the protein associating to DNA only when incorporated into the Smc5/6 complex. See also Extended Data Fig. 3c. $*P < 0.05$ by paired ANOVA relative to GFP control. Data in **a**, **b**, **d** and **e** are mean ± s.e.m.; $n = 3$ independent experiments.

complex behaves as STAT1 in the SV5-V experiment, strongly suggesting that the complex is a substrate of HBx.

This hypothesis and the key role of the Smc5/6 complex in mediating the HBx stimulatory activity were confirmed as follows. Western blot analysis revealed that Smc5 and Smc6 levels were strongly decreased in HepG2 cells expressing HBx (Fig. 2a). The same was observed with the woodchuck WHx, suggesting a conserved mechanism (Fig. 2a). This correlated with the stimulatory effects of HBx and WHx on the activity of a transiently transfected luciferase reporter construct, which, like the HBV genome, remains extrachromosomal[6]. In contrast, SV5-V triggered degradation of STAT1 but had no effect on Smc5 or Smc6 levels or reporter gene expression (Fig. 2a). HBx-mediated depletion of Smc6 was rapid, occurring concomitantly with or preceding the HBx-mediated increase in reporter gene expression (Extended Data Fig. 2a), and was inhibited by exposure to the proteasome inhibitor MG132 (Extended Data Fig. 2b), consistent with a role of proteasomes in HBx activity[18]. HBx and WHx had no impact on Smc5 and Smc6 messenger RNA levels, excluding an effect on transcription or mRNA stability (Extended Data Fig. 2c). Furthermore, pre-treatment of cells with MLN4924, an inhibitor of the E3 ubiquitin ligase family to which the DDB1 E3 ligase belongs[19,20], abrogated the effects of HBx and WHx both on reporter gene activity and on Smc5 and Smc6 protein levels (Fig. 2b and Extended Data Fig. 2d). This implicates the DDB1 E3 ubiquitin ligase activity in HBx function. Consistently, HBx retained transactivation activity and the ability to decrease Smc5 and Smc6 protein levels when fused to wild-type DDB1 but not to the mutant that cannot incorporate into the E3 ligase (Fig. 2c and Extended Data Fig. 2e).

The above results are consistent with HBx and WHx using the DDB1 E3 ubiquitin ligase to target the Smc5/6 complex for ubiquitin-mediated proteasome degradation. They further suggest that this event explains the stimulatory effect of HBx on extrachromosomal reporter gene activity. To test the latter hypothesis, we monitored the consequence of depleting Smc5 or Smc6 by RNA interference. HepG2 cell lines were generated to express doxycycline-inducible short hairpin (sh) RNA targeting Smc5, Smc6, or Cardif (MAVS) as a control. Dual *Renilla* and firefly luciferase reporter genes driven by unrelated promoters were tested in pairwise combinations in these cells, with one being integrated into the chromosomes and the other transiently transfected, and therefore episomal. All three reporter constructs tested responded to HBx only as episomal templates (Fig. 2d and Extended Data Fig. 2f, g). This was consistent with our earlier observation that HBx stimulates extrachromosomal DNA templates selectively and independently of promoter type[6]. Depletion of Smc5 or Smc6, which destabilizes the

© 2016 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

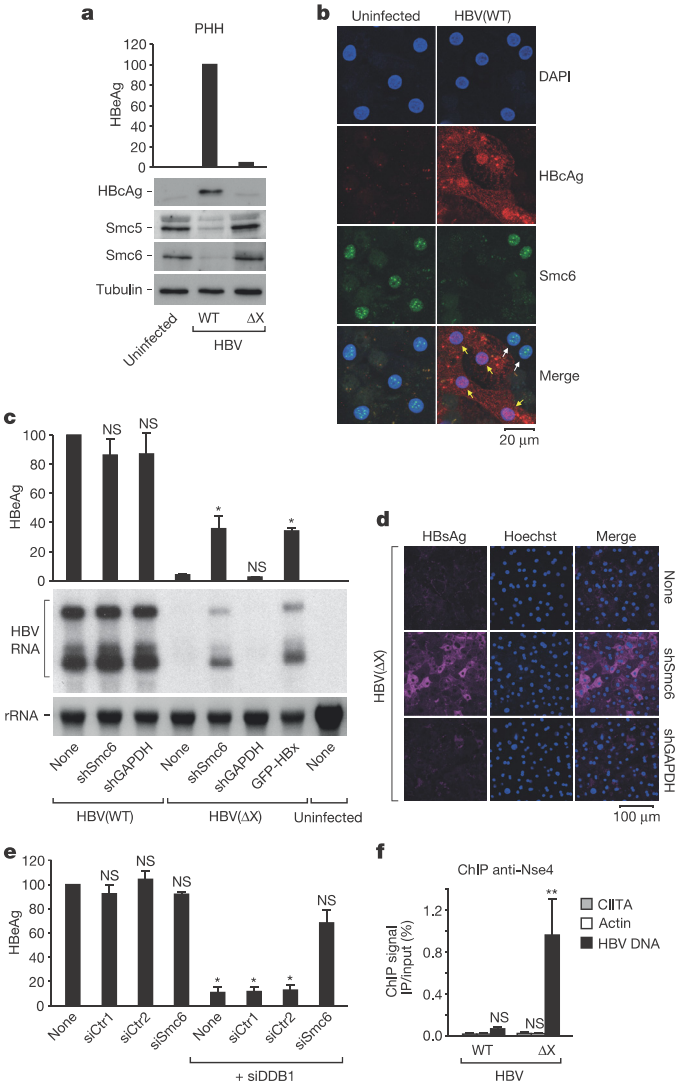


Figure 3 | HBx promotes HBV transcription in PHHs by preventing Smc5/6 binding to the viral genome. a, Purified PHHs were left uninfected or infected with wild-type or HBx-deficient (ΔX) HBV. HBeAg secretion, a marker for HBV gene expression, and indicated proteins were quantified 10 days later by ELISA and western blot. HBcAg is the viral capsid. HBeAg concentrations are relative to wild-type HBV, which was set to 100. See also Extended Data Fig. 6a. **b**, Confocal microscopy of control (left) and HBV-infected (right) PHHs stained for HBcAg (red) and Smc6 (green). Cell nuclei visualized with 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, blue). HBcAg-positive and -negative cells are indicated by yellow and white arrows, respectively. See also Extended Data Fig. 7. **c**, PHHs were mock transduced (none) or transduced 1 day before HBV infection with indicated shRNAs or GFP–HBx. HBeAg secretion and viral RNA production were assessed 8 days later by ELISA and northern blot. Mean ± s.e.m.; $n = 4$ independent experiments with three different PHH donors. $^*P < 0.05$ by paired ANOVA relative to matched no shRNA control (none). **d**, Same as in **c** but cells infected with HBx-mutant HBV were examined for surface antigen (HBsAg) positivity 12 days after infection. Cell nuclei stained with Hoechst dye (blue). **e**, PHHs were mock transfected (none) or transfected with indicated siRNAs 4 days before HBV infection. HBeAg secretion was measured 13 days later. Mean ± s.e.m.; $n = 4$ independent experiments with two different PHH donors. $^*P < 0.05$ by paired ANOVA relative to no siRNA control (none). **f**, PHHs were infected as indicated. At 10 days after infection, the binding of Smc5/6 to repressed CIITA and active β-actin genes, and to episomal HBV DNA was monitored by ChIP using anti-Nse4 antibodies. Mean ± s.e.m.; $n = 3$ independent experiments with different PHH donors and virus stocks. $^{**}P < 0.01$ by unpaired ANOVA relative to WT HBV β-actin control.

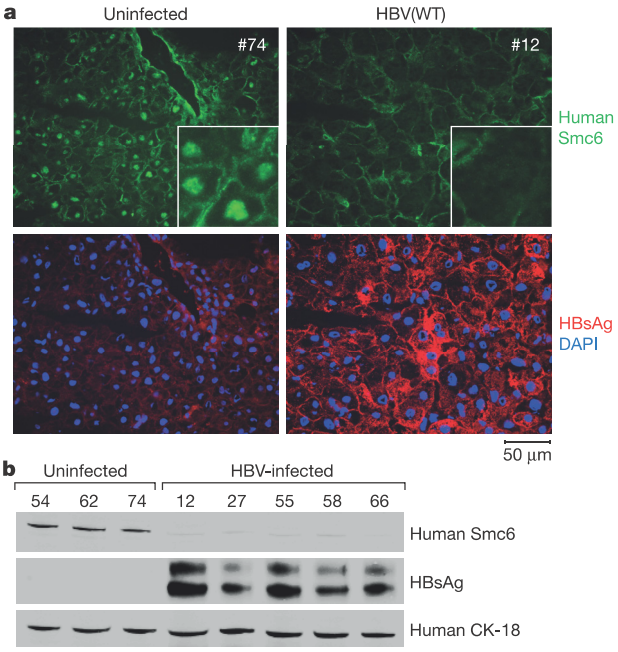


Figure 4 | HBV infection induces Smc6 degradation in humanized mouse liver tissue. a, Fresh-frozen liver tissue sections from the indicated humanized mice were stained for human Smc6 (green) and HBsAg (red). Blue, DAPI. Insets represent a digital zoom of selected areas. Note the absence of Smc6 nuclear staining in the HBV-infected tissue. See also Extended Data Figs 8 and 9. Images are representative of six HBV-infected and three uninfected humanized mice. **b**, Western blot analysis for human Smc6 and HBsAg expression in the indicated humanized liver samples. Human cytokeratin-18 (CK-18) served as a control.

entire Smc5/6 complex[21], stimulated expression of the three episomal constructs to levels approaching those measured in the presence of HBx, but remained without effect on the corresponding chromosomal reporters (Fig. 2d and Extended Data Fig. 2f, g). This recapitulated exactly the situation observed with HBx. Moreover, knockdown of Smc5 or Smc6 had no further effect on transcription stimulated by HBx, consistent with activation by HBx and by Smc5/6 knockdown occurring through the same pathway. HBx-mediated destruction of the Smc5/6 complex, which has been involved in cell cycle progression and recombinational DNA repair[22–24], did not alter the cell cycle or induce integration of the reporter gene into the chromosomes (Extended Data Fig. 3a, b). Instead, chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis revealed that the Smc5/6 complex binds to transiently transfected reporter plasmids but not to a chromosomally integrated reporter, and that HBx reduces this binding (Fig. 2e and Extended Data Fig. 3c). This is in line with recent *in vitro* studies[25]. Thus, HBx stimulates gene transcription mainly, if not exclusively, by triggering degradation of the Smc5/6 complex to prevent its association with episomal DNA templates.

The importance of these findings for HBV replication was examined using an infection assay of primary human hepatocytes (PHHs). In this assay, mutant HBV lacking a functional HBx gene is fully competent to enter cells and deliver its circular DNA genome into the nucleus. However, no viral gene transcription is detected[4] (Fig. 3c and Extended Data Fig. 4a). We observed that cells infected at high efficiency (Extended Data Fig. 5) with wild-type HBV displayed decreased levels of Smc5 and Smc6, but not when infected with an HBx-defective virus (Fig. 3a, b and Extended Data Figs 6a and 7). Conversely, depletion of Smc6 by shRNA (Extended Data Fig. 6b) restored replication competency to the HBx-deficient virus without affecting genome copy number (Extended Data Fig. 4b) but had no effect on replication of the wild-type virus (Fig. 3c, d and Extended Data Fig. 6c). The same was observed in HBV-permissive HepaRG

© 2016 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

cells (Extended Data Fig. 6d). Furthermore, siRNA-mediated silencing of DDB1 blocked HBV transcription, and this effect was relieved by the concomitant downregulation of Smc6 or Smc5 (Fig. 3e and Extended Data Fig. 6e–i). Thus, a major function of the HBx–DDB1 E3 ligase interaction is to target the Smc5/6 complex for destruction. ChIP analysis demonstrated that the Smc5/6 complex also associates with the HBV episomal DNA genome, and that binding was reduced in the presence of HBx (Fig. 3f).

In summary, our results indicate that the Smc5/6 complex binds episomal DNA templates and inhibits their transcription. HBx, by destroying the complex, relieves the inhibition to allow productive HBV gene expression. Further supporting this notion, HBV-infected humanized mouse liver tissues show markedly reduced levels of Smc6 (Fig. 4 and Extended Data Figs 8 and 9). This points to a novel role for the Smc5/6 complex as a host restriction factor, and offers a potential new avenue for therapeutic intervention against HBV infection. The Smc5/6 complex is, together with condensin and cohesin, one of the three related Smc complexes identified in eukaryotes[26]. These complexes share a similar architecture and play fundamental roles in chromosome organization, segregation, and repair (reviewed in ref. 27). The Smc5/6 complex has well-recognized functions in homologous recombination-mediated DNA repair[15,16]. In addition, the complex has been implicated in DNA replication, chromosome topology, and transcription, but little is known of its precise function[15–17,24]. A role in host defence against viral infection has not previously been reported. It will be interesting to determine whether the restrictive activity of the Smc5/6 complex is connected to any of its cellular functions, and whether the complex exhibits antiviral activity against other episomal DNA viruses.

Online Content Methods, along with any additional Extended Data display items and Source Data, are available in the online version of the paper; references unique to these sections appear only in the online paper.

Received 5 February 2014; accepted 27 January 2016.

1. Seeger, C. & Mason, W. S. Hepatitis B virus biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64,** 51–68 (2000).
2. Ganem, D. & Prince, A. M. Hepatitis B virus infection — natural history and clinical consequences. *N. Engl. J. Med.* **350,** 1118–1129 (2004).
3. Benhenda, S., Cougot, D., Buendia, M. A. & Neuveut, C. Hepatitis B virus X protein molecular functions and its role in virus life cycle and pathogenesis. *Adv. Cancer Res.* **103,** 75–109 (2009).
4. Lucifora, J. *et al.* Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J. Hepatol.* **55,** 996–1003 (2011).
5. Feitelson, M. A., Bonamassa, B. & Arzumanyan, A. The roles of hepatitis B virus-encoded X protein in virus replication and the pathogenesis of chronic liver disease. *Expert Opin. Ther. Targets* **18,** 293–306 (2014).
6. van Breugel, P. C. *et al.* Hepatitis B virus X protein stimulates gene expression selectively from extrachromosomal DNA templates. *Hepatology* **56,** 2116–2124 (2012).
7. Leupin, O., Bontron, S., Schaeffer, C. & Strubin, M. 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 (2005).
8. Li, T., Robert, E. I., van Breugel, P. C., Strubin, M. & Zheng, N. A promiscuous α-helical motif anchors viral hijackers and substrate receptors to the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase machinery. *Nature Struct. Mol. Biol.* **17,** 105–111 (2010).
9. Hodgson, A. J., Hyser, J. M., Keasler, V. V., Cang, Y. & Slagle, B. L. Hepatitis B virus regulatory HBx protein binding to DDB1 is required but is not sufficient for maximal HBV replication. *Virology* **426,** 73–82 (2012).
10. Sitterlin, D., Bergametti, F. & Transy, C. UVDDB p127-binding modulates activities and intracellular distribution of hepatitis B virus X protein. *Oncogene* **19,** 4417–4426 (2000).
11. Ulane, C. M. & Horvath, C. M. Paramyxoviruses SV5 and HPIV2 assemble STAT protein ubiquitin ligase complexes from cellular components. *Virology* **304,** 160–166 (2002).
12. Precious, B., Childs, K., Fitzpatrick-Swallow, V., Goodbourn, S. & Randall, R. E. Simian virus 5 V protein acts as an adaptor, linking DDB1 to STAT2, to facilitate the ubiquitination of STAT1. *J. Virol.* **79,** 13434–13441 (2005).
13. Leupin, O., Bontron, S. & Strubin, M. Hepatitis B virus X protein and simian virus 5 V protein exhibit similar UV-DDB1 binding properties to mediate distinct activities. *J. Virol.* **77,** 6274–6283 (2003).
14. Benhenda, S. *et al.* Methyltransferase PRMT1 is a binding partner of HBx and a negative regulator of hepatitis B virus transcription. *J. Virol.* **87,** 4360–4371 (2013).
15. Murray, J. M. & Carr, A. M. Smc5/6: a link between DNA repair and unidirectional replication? *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **9,** 177–182 (2008).
16. De Piccoli, G., Torres-Rosell, J. & Aragón, L. The unnamed complex: what do we know about Smc5-Smc6? *Chromosome Res.* **17,** 251–263 (2009).
17. Jeppsson, K., Kanno, T., Shirahige, K. & Sjögren, C. The maintenance of chromosome structure: positioning and functioning of SMC complexes. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **15,** 601–614 (2014).
18. Zhang, Z., Sun, E., Ou, J. H. & Liang, T. J. Inhibition of cellular proteasome activities mediates HBX-independent hepatitis B virus replication *in vivo*. *J. Virol.* **84,** 9326–9331 (2010).
19. Soucy, T. A. *et al.* An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature* **458,** 732–736 (2009).
20. Emanuele, M. J. *et al.* Global identification of modular cullin-RING ligase substrates. *Cell* **147,** 459–474 (2011).
21. Taylor, E. M., Copsey, A. C., Hudson, J. J., Vidot, S. & Lehmann, A. R. Identification of the proteins, including MAGEG1, that make up the human SMC5-6 protein complex. *Mol. Cell. Biol.* **28,** 1197–1206 (2008).
22. Kegel, A. & Sjögren, C. The Smc5/6 complex: more than repair? *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **75,** 179–187 (2010).
23. Potts, P. R., Porteus, M. H. & Yu, H. Human SMC5/6 complex promotes sister chromatid homologous recombination by recruiting the SMC1/3 cohesin complex to double-strand breaks. *EMBO J.* **25,** 3377–3388 (2006).
24. Tapia-Alveal, C., Lin, S. J. & O'Connell, M. J. Functional interplay between cohesin and Smc5/6 complexes. *Chromosoma* **123,** 437–445 (2014).
25. Kanno, T., Berta, D. G. & Sjögren, C. The Smc5/6 complex is an ATP-dependent intermolecular DNA linker. *Cell Reports* **12,** 1471–1482 (2015).
26. Aragon, L., Martinez-Perez, E. & Merkenschlager, M. Condensin, cohesin and the control of chromatin states. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **23,** 204–211 (2013).
27. Hirano, T. At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **7,** 311–322 (2006).

Supplementary Information is available in the online version of the paper.

Acknowledgements We are most grateful to M. Rivoire for providing liver samples, L. Lefrancois and M. Michelet for help in preparing hepatocytes, U. Protzer for the HBV(ΔX)-producing cell line, C. J. Gloeckner for the StrepII/Flag TAP-tag construct, C. E. P. Goldring for the tetracyclin-inducible HepG2 cell line, S. Elledge for the lentiviral pINDUCER vectors, A. R. Lehmann for anti-Smc5 and anti-Smc6 antibodies, M. A. Petit for anti-HBsAg and anti-HBcAg antibodies, D. Garcin for the Cardif shRNA construct, Q. Seguín-Estévez, Y. Grimaldi and P. Ferrari for help with the ChIP assay, P. Arboit and the Geneva Proteomics Core Facility for mass spectrometry analysis, the Centre d'imagerie Quantitative Lyon-Est for help in confocal microscopy, A. Joshi for statistical analysis support, and J. Curran for reading the manuscript. This study was supported by grants from CLARA (Lyon) and the French National Agency for Research against AIDS and viral hepatitis (ANRS) (to O.H.) and from the Swiss National Science Foundation (31003A-127384 and 310030-149626) (to M.S.) and by the Canton of Geneva (to M.S).

Author Contributions A.D. performed the experiments shown in Figs 1c and 2c–e and Extended Data Figs 2e–g and 3b, c, and performed the ChIP assay in Fig. 3f. H.M. performed the experiments shown in Fig. 2a, b and Extended Data Fig. 2a, d. P.C.v.B. established the TAP approach and performed the experiments shown in Fig. 1b and Extended Data Fig. 1. F.A. performed the experiments in Extended Data Figs 2b, c and 3a, c, the western blots in Fig. 3a and Extended Data Fig. 6b, and contributed to Fig. 2e and Extended Data Fig. 3c. O.H. and L.G. performed the PHH infection experiments in Fig. 3a, c, d and Extended Data Figs 4, 5 and 6a–c, the HepaRG experiment in Extended Data Fig. 6d, and contributed to Fig. 3f. C.M.L. performed the confocal and epifluorescence microscopy experiments in Figs 3b and 4a and Extended Data Figs 7–9 and contributed to Fig. 4b. C.N. and R.K.B. performed the PHH experiments in Fig. 3e and Extended Data Fig. 6e, f, h, i. R.K.B. performed the western blots in Fig. 4b and Extended Data Fig. 6g and contributed to Fig. 3f. All authors designed the experiments and interpreted the results. M.S. wrote the paper with input from all authors.

Author Information Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints. The authors declare competing financial interests: details are available in the online version of the paper. Readers are welcome to comment on the online version of the paper. Correspondence and requests for materials should be addressed to O.H. (olivier.hantz@inserm.fr), S.P.F. (Simon.Fletcher@gilead.com) or M.S. (michel.strubin@unige.ch).

© 2016 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

METHODS

Expression plasmids. HBx fused at its carboxy (C) terminus via a 10-amino-acid linker (HMRSRSGLET) either to wild-type DDB1 or to the CUL4-binding-defective DDB1 mutant has been described[8,28]. The SV5-V–DDB1 fusions were generated by replacing the sequence encoding HBx within the HBx–DDB1 fusions by the full-length SV5-V coding region[13]. Unless fused to DDB1, all viral proteins contain an amino (N)-terminal GFP tag and have been described[6]. For TAP, the proteins carried an N-terminal Flag tag followed by two Strep-tag II sequences (FS-tag)[29]. For ChIP analysis, the full-length NSE4a coding region was amplified by PCR from a Namalwa B cell complementary DNA (cDNA) library and fused N-terminal to three tandem copies of the HA epitope. Proteins were expressed from a stably integrated tetracycline-inducible pTRE2hyg plasmid vector (Clontech) in Fig. 1b and Extended Data Fig. 1a, b, from the episomal Epstein–Barr virus-based expression vector EBS-PL[30] in Fig. 1c and Extended Data Fig. 1d, from the tetracycline-inducible lentiviral vector pINDUCER20 (ref. 31) (a gift from S. Elledge) in Fig. 2c and Extended Data Fig. 2e, and from the lentivirus vector pWPT[6,7] in all the other figures.

Luciferase reporter constructs. The luciferase reporter genes were constructed into pcDNA3 (pGL3 in the case of HBV Enhancer I[6]) for transient transfection and into the self-inactivating lentiviral vector pWPT (pWPXL in the case of HBV Enhancer I[6]) for chromosomal integration. In Extended Data Fig. 3c, the EF1α episomal reporter was delivered using an integrase-defective (D116A) lentiviral vector[32].

RNA interference. The short hairpin RNAs (shRNAs) used for Smc5 and Smc6 knockdown were cloned into the miR30 context as 116-nucleotide XhoI–EcoRI fragments into pINDUCER10 (ref. 31) and/or pGIPZ (Open Biosystems) lentiviral vectors. The sequences were as follows, with the hairpin sequence in capital letters and flanking miR30 sequences shaded in bold type: shSmc5(1), **gagcg**GTGAGGTGAAAGAAGTGTTTCTtagtgaagccacagatgtaAGAAACACTTC TTTCACCTCAT**tgcct**; shSmc5(2), **gagcg**GTGCGAAACTTGTTACCGAATT tagtgaagccacagatgtaAATTCGGTAACAAGTTTCGCAT**tgcct**; shSmc6(1), **gagcg**GTGAGCAGCTTTGTAAACGAATtagtgaagccacagatgtaATTCGTTTACAA AGCTGCTCAT**tgcct**; shSmc6(2) (from Thermo Scientific (V3LHS_325916), **gagcg**CAGAGACAGTGCTACTAATCAAtagtgaagccacagatgtaTTGATTAGTAG CACTGTCTCTA**tgcct**.

The constructs used were shSmc5(2) and shSmc6(1) in Fig. 2d, shSmc5(1) and shSmc6(2) in Extended Data Fig. 2f, and shSmc6(2) in Extended Data Fig. 2g. The Cardif shRNA construct in pINDUCER10 was a gift from D. Garcin. The GAPDH shRNA construct in pGIPZ was purchased from Thermo Scientific (RHS4371). Expression was from pINDUCER10 in Fig. 2d and Extended Data Fig. 2f, g and from pGIPZ in Fig. 3c, d. Details of plasmid constructions are available upon request. The sequences of the siRNAs used in the other figures can be found in Supplementary Table 2.

Cell culture and establishment of stable cell lines. The human hepatoma cell lines HepG2 (ATCC HB-8065), HepG2$^{tet\text{-}on}$ (ref. 33), and derivatives were grown at 37 °C under 5% CO_2 in modified Eagle's medium (MEM; Life Technologies or Sigma-Aldrich) supplemented with 10% (vol/vol) fetal calf serum (Gibco), 1% (v/v) penicillin/streptomycin solution, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, and 0.1 mM MEM non-essential amino acids solution (all from Life Technologies). In Extended Data Fig. 6d, HepaRG cells were cultured, induced to differentiate, and infected with HBV as described[34]. The cell lines were not authenticated or tested for *Mycoplasma* contamination because of their direct purchase from ATCC or low passage number.

The stable HepG2 cell lines used in Fig. 1b and Extended Data Fig. 1a, b that expressed the tetracycline-inducible transactivator rtTA and various FS-tagged proteins from a tetracycline-responsive promoter were established as follows. The HepG2$^{tet\text{-}on}$ parental cell line[33] was plated at a density of 1×10^5 cells per 6-cm dish and transfected using FuGENE HD (Roche) with the relevant constructs cloned into pTRE2hyg (Clontech), which carries a hygromycin resistance marker. At day 3 after transfection, cells were selected in medium containing 250 μg ml^{-1} hygromycin B (PAA Laboratories) and 100 μg ml^{-1} G418 (Geneticin, Gibco)[33]. Resistant colonies were picked and expanded in 48-well plates under the same selection conditions. Individual clones were assayed by reverse transcription (RT)-PCR and western blot analyses for transgene expression in the presence or absence of 2 μg ml^{-1} doxycycline (Sigma Aldrich).

The HepG2 cells in Fig. 2c expressing the doxycycline-inducible HBx–DDB1 fusions from pINDUCER20 lentiviral vector carrying a neomycin resistance marker were obtained by selection for 2 days with 1 mg ml^{-1} G418 (Promega) starting at day 3 after transduction.

The HepG2 cells in Fig. 2d and Extended Data Fig. 2f, g expressing doxycycline-inducible shRNAs against Smc5, Smc6, or Cardif from pINDUCER10 lentiviral vector were obtained by selection with 10 μg ml^{-1} puromycin (Calbiochem) for 4 days starting at day 3 after transduction. The resulting puromycin-resistant cells were then cultured for 2 weeks in the absence or presence of 2.5 μg ml^{-1} doxycycline before transduction of GFP or GFP–HBx to maximally induce shRNA expression. Fluorescence microscopy indicated that >90% of the cells were expressing turboRFP (tRFP) from the tRFP-shRNA cassette[31].

The HepG2.2.15 (ref. 4), HepAD38 (ref. 35), and HepG2-H1.3x- (ref. 4) stable cell lines used to produce HBV virions carrying either a wild-type genome or a genome bearing a defective HBx gene have been described. They were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium/F-12 (DMEM/F12) complemented with 10% fetal calf serum, 1% non-essential amino acids, 50 μg ml^{-1} kanamycin, and 200 μg ml^{-1} geneticin.

Transfection, transduction, and reporter gene assay. Transfection of plasmid DNA in HepG2 cells was performed using X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche) following the manufacturer's instructions. Transfection of siRNA duplexes in HepaRG cells was performed using DharmaFECT-1 (Thermo Scientific) transfection reagent and in PHHs using Lipofectamine RNAiMax (Life Technologies). Recombinant lentivirus production and transduction of HepG2 cells were performed as described previously[7,36]. For PHH transduction, lentivirus supernatants were concentrated by ultracentrifugation at 130,000 *g* for 1 h in a SW32 Beckman rotor at 4 °C and transduction was performed overnight in the presence of 10 ng ml^{-1} of EGF[37]. For luciferase reporter gene assay and western blot analysis, cells were typically seeded at a density of about 6×10^5 cells per 30 mm diameter well (1×10^5 cells per square centimetre) and transfected the next day with 30 ng of reporter plasmid DNA and 2 μg of empty EBS-PL vector. For the ChIP experiment in Fig. 2e, 3 or 30 ng of reporter plasmid were used with similar results.

In Fig. 2d and Extended Data Fig. 2f, g, cells that had been cultured in the absence or presence of doxycyclin for 2 weeks to induce shRNA expression from pINDUCER10 were first transduced and the next day transfected with, respectively, lentiviral and plasmid constructs carrying the *Renilla* and firefly luciferase reporter genes as indicated in the figures. Cells were trypsinized the following day, washed with phosphate-buffered saline (PBS), replated in 6- or 24-well dishes at a density of about 6×10^4 cells per square centimetre and transduced 6 h after replating with lentiviral vectors encoding GFP or the GFP-tagged viral proteins. In Fig. 2b, dimethylsulphoxide (DMSO) or 5 μM MLN4924 (Active Biochem) was added 6 h before transduction and culture medium was replaced daily with fresh medium containing (or not) MLN4924 for 3 days. In Fig. 2c, d and Extended Data Fig. 2f, g, cells were constantly grown in the absence or presence of 2 μg ml^{-1} doxycycline. Cell lysates were prepared 6 days later (3 days in Fig. 2b) for luciferase assay and western blot analysis. Luciferase activities were measured using the Luciferase Assay System (Promega) or Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) according to the manufacturer's instructions. The activities were normalized to protein concentrations as measured by the Bradford assay (Bio-Rad).

Purification of Flag–StrepII-tagged proteins. The two-step purification scheme was adapted from ref. 29. The HepG2$^{tet\text{-}on}$ cell lines conditionally expressing FS-tagged proteins from a doxycycline-inducible promoter were seeded on thirty 15-cm dishes and allowed to reach 90% confluence. Expression of the FS-tagged proteins was then induced by addition of doxycycline (2 μg ml^{-1}) for 48 h. Cells were rinsed once with 20 ml PBS (per plate) and scraped off after incubation on ice for 20 min in 1.5 ml lysis buffer (50 mM HEPES/KOH, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 50 μM $ZnCl_2$, 0.1% IGEPAL and protease inhibitor cocktail from Sigma). The lysates were pooled, supplemented with glycerol (10% final), and clarified by centrifugation at 20,000*g* for 20 min at 4 °C in a Sorvall HB-6 rotor. Supernatants were collected, passed through a 0.45 μm Millipore PVDF filter, and mixed in a 50 ml Falcon tube with a 100 μl packed bead volume of Strep-Tactin Sepharose (IBA) washed with lysis buffer. After incubation for 2 h at 4 °C under constant rotation, the suspension was poured into a 10 ml disposable column (Bio-Rad). After sedimentation, the resin was washed twice with 10 ml lysis buffer containing 10% glycerol. The bound proteins were released by incubating the resin with 10 ml of lysis buffer supplemented with 10% glycerol and 2.5 mM desthiobiotin (IBA 2× Tactin Elution Buffer) for 10 min on ice. The eluted material was directly mixed with a 100 μl packed volume of washed anti-Flag Sepharose beads (Sigma) and incubated with rotation for 1 h at 4 °C in a sealed 10 ml disposable column (Bio-Rad). Subsequently, the column was drained by gravity and the resin washed five times with 1 ml lysis buffer adjusted to 10% glycerol. Bound proteins were recovered by adding five times sequentially 200 μl lysis buffer supplemented with 200 μg ml^{-1} Flag peptide (Sigma) and gently mixing for 5 min on ice. The eluted material from three such purifications was pooled and precipitated with acetone (80% final concentration). After centrifugation at 4 °C in an Eppendorf microcentrifuge, the protein pellet was air-dried, resuspended in 1× Laemmli sample buffer, and run into a 4% SDS–PAGE stacking gel. The protein band was excised and processed for mass spectrometry analysis using an LTQ-Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Scientific). Listed in Fig. 1b are proteins identified

© 2016 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

with 99% certainty and represented by at least two peptides ascertained at a 95% confidence level.

In Fig. 1c, extracts from 6×10^6 HepG2 cells seeded on a 10-cm culture dish were prepared 2 days after transfection with 2 μg of EBS-PL expression plasmids. The experiment in Extended Data Fig. 1d was performed in the same way except that the transfected cells were selected in medium containing 200 μg ml^{-1} hygromycin B (PAA Laboratories) and extracts were prepared from a 15-cm dish of confluent cells. Proteins were purified by incubation with 25 μl packed bead volume of Strep-Tactin Sepharose (IBA).

Cell cycle analysis. The cell cycle analysis in Extended Data Fig. 3a was performed starting with 1.5×10^6 HepG2 cells transduced with GFP or GFP–HBx and cultured as above. Cells were harvested, washed once with PBS, and recovered by centrifugation at 500*g* for 5 min. Cells were fixed in 1 ml ice-cold 70% ethanol added dropwise while vortexing and incubated for 30 min on ice. The fixed cells were pelleted by centrifugation at 800*g* for 15 min, washed twice with PBS and directly resuspended in 50 μl PBS supplemented with 100 μg ml^{-1} RNase A (Roche). Cellular DNA was stained by addition of 600 μl of propidium iodide (Sigma Aldrich; 50 μg ml^{-1} in PBS) and incubation for 10 min at room temperature (20–25 °C) and overnight at 4 °C. Samples were analysed using a BD Accuri C6 flow cytometer.

Western blotting. With the exception of Fig. 4b and Extended Data Fig. 6g (see below), western blot analysis was performed as described[38] except that cells were disrupted in 2% SDS in water and protein concentration was estimated using the BCA Protein Assay (Novagen). The membranes were probed with 1:5,000 mouse anti-Flag antibodies (Sigma A2220) to detect the FS-tagged HBx–DDB1 and SV5-V–DDB1 fusion proteins, 1:5,000 mouse monoclonal anti-GFP (Roche 11814460001) to detect GFP–HBx in Extended Data Fig. 2a, b, 1:5,000 mouse monoclonal anti-HA (clone 16B12, Covance) to detect HA-Nse4 in Fig. 2e, 1:2,000 rabbit polyclonal antibodies against Smc5 or Smc6 (ref. 39) (a gift from A. R. Lehmann), 1:1,000 rabbit polyclonal anti-Nse4 (Abgent AP9909A), 1:2,000 rabbit polyclonal anti-Cardif/MAVS (Enzo Life Sciences ALX-210-929), 1:500 mouse monoclonal anti-STAT1 (BD Transduction Laboratories G16920), 1:500 goat polyclonal anti-DDB1 (Everest Biotech), 1:500 rabbit polyclonal anti-HBc (a gift from M. A. Petit), 1:500 mouse monoclonal anti-ubiquitin (Santa Cruz SC-8017), 1:10,000 mouse monoclonal anti-α-tubulin (Sigma-Aldrich T5168), or 1:10,000 mouse monoclonal anti-GAPDH (Sigma-Aldrich G8795) antibodies. Horseradish-peroxidase-conjugated sheep anti-rabbit or anti-mouse, or bovine anti-goat IgG (Amersham Biosciences, 1:5,000), were used as secondary antibodies, and detection was performed with ECL (Pierce).

In Fig. 4b, flash-frozen liver tissue from uPA-SCID mice re-populated with human hepatocytes was homogenized in RIPA buffer containing a broad spectrum protease inhibitor cocktail (Fisher Scientific PI-78430) using a Qiagen Tissue Lyser for mechanical tissue disruption. The resulting homogenates were clarified by centrifugation for 10 min at 4 °C in an Eppendorf 5415D microcentrifuge equipped with a fixed-angle rotor (F45-24-11) at 15,996*g*. Protein concentration was determined using the Bradford Protein assay (Bio-Rad). The membranes were probed with 1:1,000 mouse monoclonal anti-human SMC6 (Abgent AT3956A), 1:1,000 mouse anti-HBsAg (International ImmunoDiagnostics 1113), and 1:1,000 monoclonal mouse anti-human CK-18 (Dako M701029-2). IRDye 680RD goat anti-rabbit or IRDye 800CW goat anti-mouse IgG (Licor, 1:5,000) were used as secondary antibodies. Blots were visualized using an Odyssey Infrared Imaging System (Licor). The species specificity of the anti-human SMC6 and CK-18 antibodies was confirmed by western blot detection of Smc6 and CK-18 in HepG2 cells and PHHs but not in murine hepatocyte AML12 cells (ATCC CRL-2254, data not shown).

In Extended Data Fig. 6g, PHHs were lysed in RIPA buffer supplemented with 1× protease inhibitor cocktail (ThermoScientific), scraped from the plate, and sonicated for 10 s to break up cellular debris. Protein concentration was estimated using a BCA Protein Assay (Novagen). The membranes were probed with 1:1,000 mouse monoclonal anti-Smc5 (Bethyl Laboratories A300-236A), 1:1,000 mouse monoclonal anti-human SMC6 (Abgent AT3956A), 1:1,000 rabbit polyclonal anti-DDB1 (Cell Signaling 5428), and 1:1,000 mouse monoclonal anti-GAPDH (Novus Biologicals G8795). Secondary antibodies and detection were as in Fig. 4b.

RT–PCR analysis. In Extended Data Fig. 2c, total cellular RNA was extracted from HepG2 cells using TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies) following the manufacturer's instructions. RNA was treated with RNase-free DNase (Promega) in the presence of 1 U μl^{-1} RNAsin (Promega). After phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation, 1 μg of RNA was reverse transcribed using MLV reverse transcriptase (Promega) and an oligo(dT)15 primer. Quantification by real-time PCR was performed as described[6]. The PCR values were normalized against those obtained for the TBP gene to correct for variation between samples.

In Extended Data Fig. 6e, f, i, total cellular RNA was isolated from PHHs cultured in 96-well plates using an RNeasy 96 Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. Real-time RT–PCR was performed using a QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System (Invitrogen Life Technologies) following the manufacturer's instructions. The PCR values were normalized against those obtained for the β-actin gene to correct for variation between samples. All oligonucleotide primer sets were manufactured by Life Technologies.

Northern blot analysis. Northern blot analysis in Fig. 3c and Extended Data Fig. 6c was performed on total RNA isolated using TRIzol Reagent (Gibco-Invitrogen) and treated with RNase-Free DNase I (Ambion, Life Technologies). The RNA (10 μg per sample) was denatured by glyoxal treatment and separated on a 1% agarose gel using a NorthernMax-Gly kit (Ambion, Life Technologies). After capillary transfer to Hybond N$^+$ membranes (Amersham), the RNA was fixed on the membrane by ultraviolet cross-linking and hybridized with a ^{32}P-labelled full-length HBV genomic DNA or 28S ribosomal RNA oligonuclotide probes.

HBV virion production. The HBV producing HepG2 cell lines[4] were grown to confluence in DMEM/F12 as described above. When confluence was reached, cells were maintained in a 1:1 mixture of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and Williams' E medium (Invitrogen Life Technologies) supplemented with 5% fetal calf serum, 7×10^{-5} M hydrocortisone hemisuccinate, 5 μg ml^{-1} insulin, and 1% DMSO. HBV-containing supernatants were collected every 2 days for 10 days. The supernatants were pooled, filtered through a 0.22 μm filtration unit (Merck Millipore), and concentrated by overnight precipitation with PEG 8000 (5% final) and centrifugation at 4 °C for 1 h at 6,000*g*. The viral pellet was resuspended in 1/50 of the original culture volume in PBS and sedimented at 4 °C through a 20 ml 10–20% sucrose gradient in PBS at 130,000*g* for 16 h in a SW32 Beckman rotor. The final pellet was resuspended in 1/100 of the original volume in William's E medium supplemented with 2% DMSO and 0.1% SVF and stored in aliquots at −80 °C. Infectious virus titre was estimated by real-time PCR quantification of the viral DNA recovered by immunoprecipitation with an excess of mouse monoclonal antibodies against the large envelope protein (preS1)[40]. Real-time PCR was performed using the SYBR Green PCR Master Mix (Roche Applied Science) and a LightCycler 480 system (Roche Applied Science) as described[34].

HBV virion production from HepAD38 cells was as follows. Cells were grown to confluence in DMEM/F12 supplemented with 10% fetal bovine serum (HyClone, Thermo Scientific), 1% non-essential amino acids, 50 μg ml^{-1} kanamycin, 200 μg ml^{-1} geneticin (all from Gibco Life Technologies), and 0.3 μg ml^{-1} tetracycline (Sigma-Aldrich). Once confluence was reached, the medium was exchanged for identical medium as above, but lacking tetracycline. After 10 days, the virus-containing medium was collected every 3–4 days for 21 days and stored at −80 °C. Subsequently, the aliquots were thawed, precipitated overnight at 4 °C using 6% PEG-8000 (Promega), and centrifuged at 4 °C for 15 min at 1,500*g*. Viral DNA was isolated using a DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Viral titre was determined by real-time PCR.

PHH isolation and HBV infection. PHHs were isolated from resected normal human liver tissue using a two-step perfusion method and cultured as described[4,41]. PHHs were infected with PCR-normalized HBV virus stocks at a multiplicity of infection of 200–400 viral genome equivalents per cell[34]. The experiments in Fig. 3b, e and Extended Data Fig. 6e–i were performed using PHHs purchased from Life Technologies and maintained in William's E medium with added supplements as specified by the vendor. Cells were infected 24 h after plating on collagen-coated 96-well plates (BD Biosciences) with HepAD38-derived HBV virions at 500 viral genome equivalents per cell. In Extended Data Fig. 6g, cells were cultured on collagen-coated six-well plates (BD Biosciences).

Human liver chimaeric uPA-SCID mice. All animal work was performed by Phoenix Bio, in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and approved by the Animal Ethics Committee of Phoenix Bio. Nine male uPA-SCID mice were transplanted at 16–23 days old with 1×10^6 PHHs from a single healthy donor as described[42]. After 10–13 weeks, six of these mice were infected by intraperitoneal injection with 5×10^5 genome equivalents of cell-culture-derived HBV genotype C. These animals were killed and serum and liver specimens were collected for measurement of HBV infection 14 weeks later. Serum HBV DNA reached a titre of $>1.5 \times 10^7$ copies per millilitre and serum HBsAg levels were $\geq 3.2 \times 10^2$ IU ml^{-1} in all infected animals. As a control, three of the nine mice were left uninfected. These animals were killed at 15 weeks after transplantation and then processed identically to the HBV-infected animals.

ELISA. The amounts of HBe and HBs antigens present in control and HBV-infected PHH culture media were determined at the indicated times by ELISA using Monolisa HBe Ag-Ab PLUS (Bio-Rad) and Monolisa anti-HBs PLUS (Bio-Rad) kits and a Chemiluminescence Immunoassay (Autobio Diagnostics) kit. In Fig. 3e and Extended Data Fig. 6h, ELISA was performed using an HBeAg EIA

© 2016 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

(International Immunodiagnostics) kit and a SpectraMax M5 reader (Molecular Devices). Purified HBeAg was used as standard.

Immunofluorescence and confocal analysis. The proportion of PHHs infected with HBV in Fig. 3d and Extended Data Fig. 5 was estimated by confocal immunofluorescence microscopy for HBsAg expression[34]. PHHs were cultured and infected on collagen-I-coated glass slides. At 9–12 days after infection, cells were fixed with 3% paraformaldehyde in PBS and permeabilized with 0.1% saponin in PBS for 30 min at room temperature. Cells were stained with mouse monoclonal anti-HBs antibodies (a gift from M. A. Petit) diluted 1:200 in PBS containing 0.1% saponin and 3% bovine serum albumin (BSA). After washing in the same buffer, bound antibodies were detected using Alexa-Fluor-647-conjugated goat anti-mouse secondary antibodies (Invitrogen). After additional washes, the slides were mounted with fluorescence mounting medium (ProLong Gold, Life Technologies) and observed under a Leica SP5 X confocal microscope. Image analysis used ImageJ software.

Confocal analysis of Smc6 expression in HBV-infected and uninfected PHHs in Fig. 3b and Extended Data Fig. 7 was performed as follows. PHHs were seeded onto rat tail collagen-I-coated glass coverslips (Corning BioCoat 354089) at a density of 1.2×10^6 cells per well of a 6-well dish and allowed to adhere overnight. Cells were then mock-infected or infected at 500 viral genome equivalents per cell with wild-type HBV derived from HepAD38 cells. On day 13 after infection, the cells were washed twice with PBS and fixed in freshly prepared 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Services RT-15710) in PBS for 10 min at room temperature. After three washes in PBS, the cells were permeabilized in 1% TX-100 in PBS for 10 min at room temperature. Coverslips were incubated overnight at 4 °C in 3% normal goat serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories 005-000-121) diluted in PBS to quench non-specific background. Coverslips were then inverted onto 100 µl droplets containing mouse anti-human SMC6 (Abgent AT3956a, 1:500) and polyclonal rabbit anti-HBcAg (Dako B0586, 1:1,600) diluted in 3% normal goat serum, and incubated at room temperature for 1 h. As a control, cells were reacted in parallel with purified mouse IgG2a isotype-matched control (Life Technologies MG2a00). After eight washes in PBS, coverslips were inverted onto 100 µl droplets of highly cross-adsorbed Alexa Fluor 488 goat-anti-mouse (Molecular Probes A11029) or Alexa Fluor 594 goat-anti-rabbit (Molecular Probes A11037) secondary antibodies diluted 1:200 in 3% normal goat serum, and incubated for 1 h at room temperature. Coverslips were washed eight times in PBS and rinsed in double-distilled water before mounting onto glass slides using Vectashield DAPI-containing hardening mounting medium (Vector Laboratories H-1500). Imaging was performed using an upright Zeiss LSM780 confocal system equipped with a ×63 objective lens (NA 1.4) and Zen software. All images within each sample set were captured using identical confocal settings. Images were adjusted for brightness and contrast using Adobe Photoshop CS6.

For immunofluorescence analysis of humanized mouse liver tissues, flash-frozen liver tissues was cryosectioned at a thickness of 5 µm onto microscope slides, fixed for 10 min in ice-cold 4% paraformaldehyde in PBS, and then washed three times in PBS. After one wash in Tween 20-containing AutoWash (BioCare Medical TWB945M), tissue sections were incubated with Rodent Block M solution (BioCare Medical RBM961L) for 30 min at room temperature, then stained overnight at 4 °C in a humidified chamber with mouse monoclonal anti-human Smc6 (Abgent AT3956a, 1:200) and rabbit polyclonal anti-HBsAg (Virostat 1811, 1:500) antibodies diluted in a 1:1 solution of Rodent Block M (BioCare Medical RBM961) and Renoir Red diluent (BioCare Medical PD904M). In parallel, re-population of liver tissue with human hepatocytes was evaluated by staining representative sections from each animal with goat anti-human albumin polyclonal antibodies (Bethyl A80-129A, 1:200), whose species specificity has been demonstrated[43], and for selected animals by co-staining with mouse monoclonal anti-human cytokeratin-18 antibody (Dako M7010, 1:25). Mouse IgG1 (Dako X0931) diluted in Dako Antibody Diluent S0809 served as a negative control (see Extended Data Fig. 9). After three 5 min washes in AutoWash buffer, tissue sections were reacted for 1 h at room temperature with Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse and Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit secondary antibodies diluted 1:1,000 in PBS. Coverslips were applied using Vectashield DAPI-containing embedding medium (Vector Laboratories H-1500). Images were acquired using a ×40 objective lens (Fig. 4a) or a ×20 objective lens (Extended Data Fig. 8) and an inverted epifluorescence microscope (Leica DM LB) and arranged using Adobe Photoshop CS6. Note that imaging in Fig. 4a and Extended Data Fig. 8a was limited to areas completely re-populated with human hepatocytes, which were readily distinguished from poorly engrafted areas of mouse liver tissue on the basis of cellular morphology Extended Data Fig. 8b.

ChIP and quantitative PCR. The ChIP analysis in Fig. 2e was performed using chromatin extracted from about 7×10^6 HepG2 cells cultured in 100 mm diameter wells as above and expressing HA-Nse4 from a lentiviral vector. In Fig. 3f, freshly prepared PHHs were seeded into 75 cm^2 collagen-coated tissue culture flasks (10^7 cells per flask). Two days later, cells were infected with wild-type or HBx-mutant HBV particles. After culture for the indicated periods, cells were fixed with 1% formaldehyde (Sigma Aldrich 47608) for 10 min at 37 °C before quenching with 330 mM glycine. Cells were rinsed twice with ice cold PBS containing EDTA-free protease inhibitors (Roche) and 5 mM Na-butyrate, scraped off in 1.5 ml of the same buffer and collected by centrifugation. Cells were resuspended and lysed for 10 min at 4 °C in 1 ml Nuclear Extraction buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM NaCl, 1% NP-40) supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche). The nuclei were recovered by centrifugation at 500*g* for 5 min at 4 °C in an Eppendorf fixed-angle rotor (FA-45-18-11) and washed once in the same buffer. Nuclei were resuspended in 100 µl FA-lysis buffer (50 mM HEPES/KOH, pH 7.5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100) containing 1% SDS and incubated for 10 min at room temperature. After addition of another 100 µl FA-lysis buffer, the mixture was transferred to 1.5 ml bioruptor microtubes (Diagenode), and sonicated using a Diagenode Bioruptor Pico water bath sonicator (ten cycles of 15 s on and 30 s off at high setting). The sonicated lysates were clarified by centrifugation at 16,000*g* for 10 min and mixed in 800 µl FA-lysis buffer supplemented with protease inhibitors with 40 µl packed bead volume of protein A-Sepharose CL-4B (GE Healthcare) coupled to 4 µl anti-HA antibodies (clone 16B12, Covance) or 6 µl anti-Nse4 antibodies (Abgent AP9909A) and pre-incubated in FA-lysis buffer with sonicated salmon sperm DNA and BSA. After an overnight incubation at 4 °C under constant rotation, the beads were sedimented by brief centrifugation and the supernatant either discarded or in Extended Data Fig. 3c directly mixed and incubated overnight at 4 °C with anti-Nse4 affinity beads as above. The beads were washed twice with 1 ml FA-lysis buffer, twice with FA-lysis buffer adjusted to 500 mM NaCl and 0.5% sodium deoxycholate, and twice with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 1 mM EDTA, 250 mM LiCl, 1% NP-40, and 1% sodium deoxycholate. Bound protein–DNA complexes were released from the HA- and Nse4-affinity resins by incubation for 10 min at 65 °C in 200 µl buffer containing 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1% SDS, 10 mM EDTA, and 10 mM EGTA. After addition of 200 µl Tris-EDTA (pH 8.0) and 60 µg proteinase K (Bioworld Technology), DNA crosslinks were reversed by overnight incubation at 65 °C. Samples were extracted twice with phenol–chloroform, once with chloroform, and then ethanol precipitated and resuspended in Tris-EDTA buffer. The input DNA treated identically and the recovered DNA were quantified in two separate real-time PCR runs using the KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal (Kapa Biosystems) and the Bio-Rad CFX96 Real-time PCR System. The values were calculated as the ratios between the ChIP signals and the respective input DNA signals. In Fig. 3e, primers specific for the covalently closed circular HBV DNA (cccDNA)[14] were used. Sequences of the oligonucleotide primers are given in Supplementary Table 2.

Statistical analysis. No statistical methods were used to predetermine sample size. Statistical significance was tested using a one-tailed, paired *t*-test (for two sample comparisons) or one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison correction of log-transfomed data (for multiple comparisons). A value of $P < 0.05$ was considered significant. The experiments were not randomized, and the investigators were not blinded to allocation during experiments and outcome assessment.

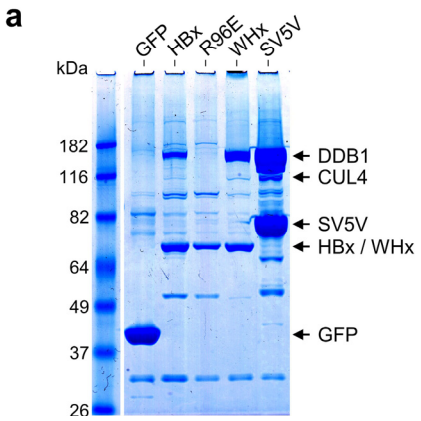
Ethics statement. PHHs were isolated from liver specimens resected from patients undergoing partial hepatectomy (provided by M. Rivoire). Approval from the local and national ethics committees (French Ministry of Research and Education numbers AC-2013-1871 and DC-2013-1870) and informed consent from patients were obtained.

28. Lin-Marq, N., Bontron, S., Leupin, O. & Strubin, M. Hepatitis B virus X protein interferes with cell viability through interaction with the p127-kDa UV-damaged DNA-binding protein. *Virology* **287,** 266–274 (2001).
29. Gloeckner, C. J., Boldt, K., Schumacher, A., Roepman, R. & Ueffing, M. A novel tandem affinity purification strategy for the efficient isolation and characterisation of native protein complexes. *Proteomics* **7,** 4228–4234 (2007).
30. Bontron, S., Lin-Marq, N. & Strubin, M. 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 (2002).
31. Meerbrey, K. L. *et al.* The pINDUCER lentiviral toolkit for inducible RNA interference in vitro and in vivo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108,** 3665–3670 (2011).
32. De Iaco, A. & Luban, J. Inhibition of HIV-1 infection by TNPO3 depletion is determined by capsid and detectable after viral cDNA enters the nucleus. *Retrovirology* **8,** 98 (2011).
33. Goldring, C. E. *et al.* Development of a transactivator in hepatoma cells that allows expression of phase I, phase II, and chemical defense genes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **290,** C104–C115 (2006).
34. Hantz, O. *et al.* Persistence of the hepatitis B virus covalently closed circular DNA in HepaRG human hepatocyte-like cells. *J. Gen. Virol.* **90,** 127–135 (2009).

© 2016 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

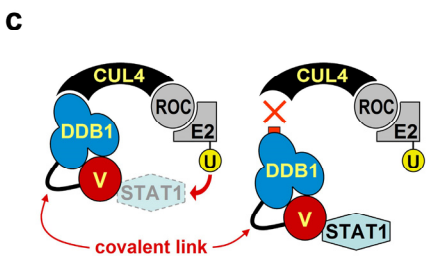
35. Ladner, S. K. *et al.* Inducible expression of human hepatitis B virus (HBV) in stably transfected hepatoblastoma cells: a novel system for screening potential inhibitors of HBV replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41,** 1715–1720 (1997).
36. Kutner, R. H., Zhang, X. Y. & Reiser, J. Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. *Nature Protocols* **4,** 495–505 (2009).
37. Rothe, M. *et al.* Epidermal growth factor improves lentivirus vector gene transfer into primary mouse hepatocytes. *Gene Ther.* **19,** 425–434 (2012).
38. Martin-Lluesma, S. *et al.* Hepatitis B virus X protein affects S phase progression leading to chromosome segregation defects by binding to damaged DNA binding protein 1. *Hepatology* **48,** 1467–1476 (2008).
39. Taylor, E. M. *et al.* Characterization of a novel human SMC heterodimer homologous to the *Schizosaccharomyces pombe* Rad18/Spr18 complex. *Mol. Biol. Cell* **12,** 1583–1594 (2001).
40. Chemin, I. *et al.* Correlation between HBV DNA detection by polymerase chain reaction and Pre-S1 antigenemia in symptomatic and asymptomatic hepatitis B virus infections. *J. Med. Virol.* **33,** 51–57 (1991).
41. Gripon, P., Diot, C. & Guguen-Guillouzo, C. Reproducible high level infection of cultured adult human hepatocytes by hepatitis B virus: effect of polyethylene glycol on adsorption and penetration. *Virology* **192,** 534–540 (1993).
42. Fujiwara, S. *et al.* A novel animal model for *in vivo* study of liver cancer metastasis. *World J. Gastroenterol.* **18,** 3875–3882 (2012).
43. Ishida, Y. *et al.* Novel robust *in vitro* hepatitis B virus infection model using fresh human hepatocytes isolated from humanized mice. *Am. J. Pathol.* **185,** 1275–1285 (2015).
44. Andrejeva, J. *et al.* The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101,** 17264–17269 (2004).

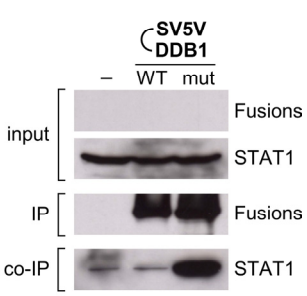
© 2016 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

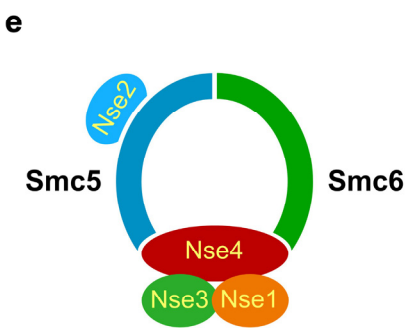


b

SV5-V	#pep	%cov
SV5-V	14	72
DDB1 E3 ligase		
DDB1	63	52
CUL4A	17	24
CUL4B	3	10
Other		
MDA5	14	18
HSC71	2	4

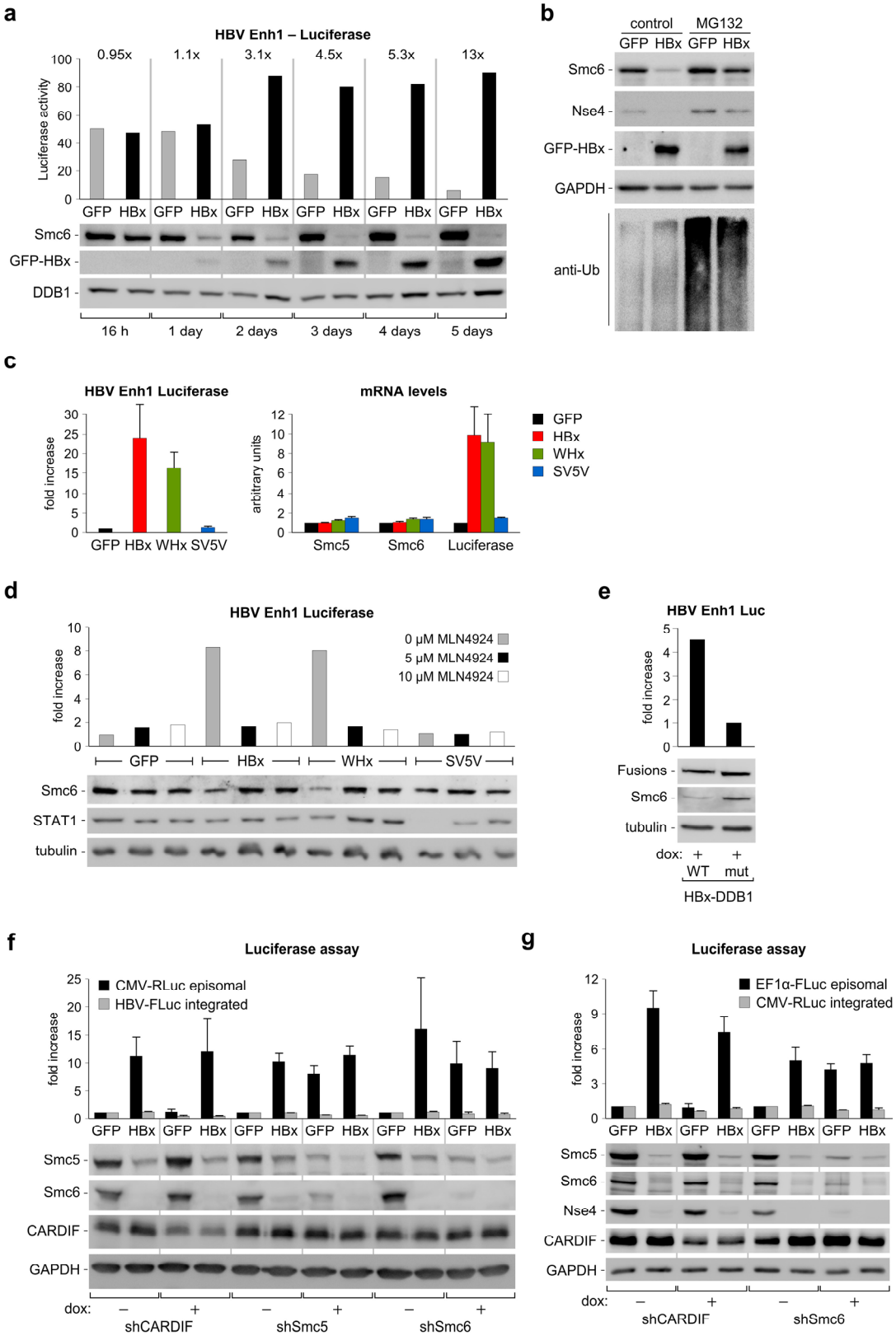






Extended Data Figure 1 | A strategy to identify E3 ubiquitin ligase substrates. a, Stable HepG2 cell lines were generated expressing GFP or the indicated GFP-tagged viral proteins carrying an N-terminal tandem Flag/StrepII (FS) tag from a doxycycline-inducible promoter (ref. 29 and see Methods). After doxycycline induction, whole-cell extracts were prepared and the FS-tagged and associated proteins were purified by TAP. Eluted proteins were separated by gel electrophoresis and stained with Coomassie blue. CUL4 was identified by mass spectrometry. No protein candidate was identified showing a profile predicted for an HBx substrate: that is, co-purifying specifically with HBx and WHx but not with SV5-V, or co-purifying only with the DDB1-binding-defective HBx(R96E) mutant because of its otherwise unstable interaction with HBx and WHx when recruited to the E3 ligase. In particular, the Smc5/6 complex was not detected in these purifications. **b**, Purification of SV5-V and associated proteins. FS-tagged SV5-V was purified from a stably expressing HepG2 cell line by TAP as above. Proteins were eluted under native conditions and processed for analysis by peptide fragmentation sequencing (nano-LC–ESI MS/MS). The number of unique peptides for each protein and the percentage of total protein sequence covered by these peptides are indicated. Listed are proteins identified with 100% certainty and represented by at least two peptides identified at a 95% confidence level. CUL4A and CUL4B are closely related paralogs. Note that no peptides were detected, even at low confidence level, for STAT1 that is well known to be recruited by SV5-V to the DDB1 E3 ligase for ubiquitin-mediated degradation. By contrast MDA5, a cytoplasmic sensor of viral RNA to which SV5-V also binds but, in contrast to STAT1, without causing its degradation[44], was present in the SV5-V purifications. This suggests that, in contrast to MDA5, STAT1 associates with SV5-V very transiently, presumably because of its rapid degradation or dissociation from the E3 ligase complex. We considered that the same may be true for the HBx target, thus precluding its identification by regular affinity purification. **c**, As a proof of principle for the use of a fusion strategy to identify the HBx target, we covalently linked SV5-V to wild-type DDB1 or to a CUL4-binding-defective DDB1 mutant that could not incorporate in the E3 ligase complex. See text for details. **d**, HepG2 cells were mock transfected (–) or transfected with plasmid DNA expressing the indicated FS-tagged SV5-V–DDB1 fusions. Whole-cell extracts were prepared and the fusion proteins purified by a single round of affinity purification. The amounts of fusion proteins recovered (IP) and the presence of STAT1 in the eluates (co-IP) were assessed by western blotting. The fusion proteins were revealed using anti-Flag antibodies and were expressed at too low levels for detection in the crude extracts (input). Note that high amounts of STAT1 are recovered only with the mutant SV5-V–DDB1 fusion. **e**, Architecture of the Smc5/6 complex. The core of the Smc5/6 complex is formed by a heterodimer of Smc5 and Smc6. The two proteins form a V-shaped structure and associate with four non-SMC proteins, designated Nse1–Nse4 (refs 15, 17). Note that depletion of any of the Smc5/6 complex subunit, other than Nse2, results in destabilization and degradation of the entire complex[21].

© 2016 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

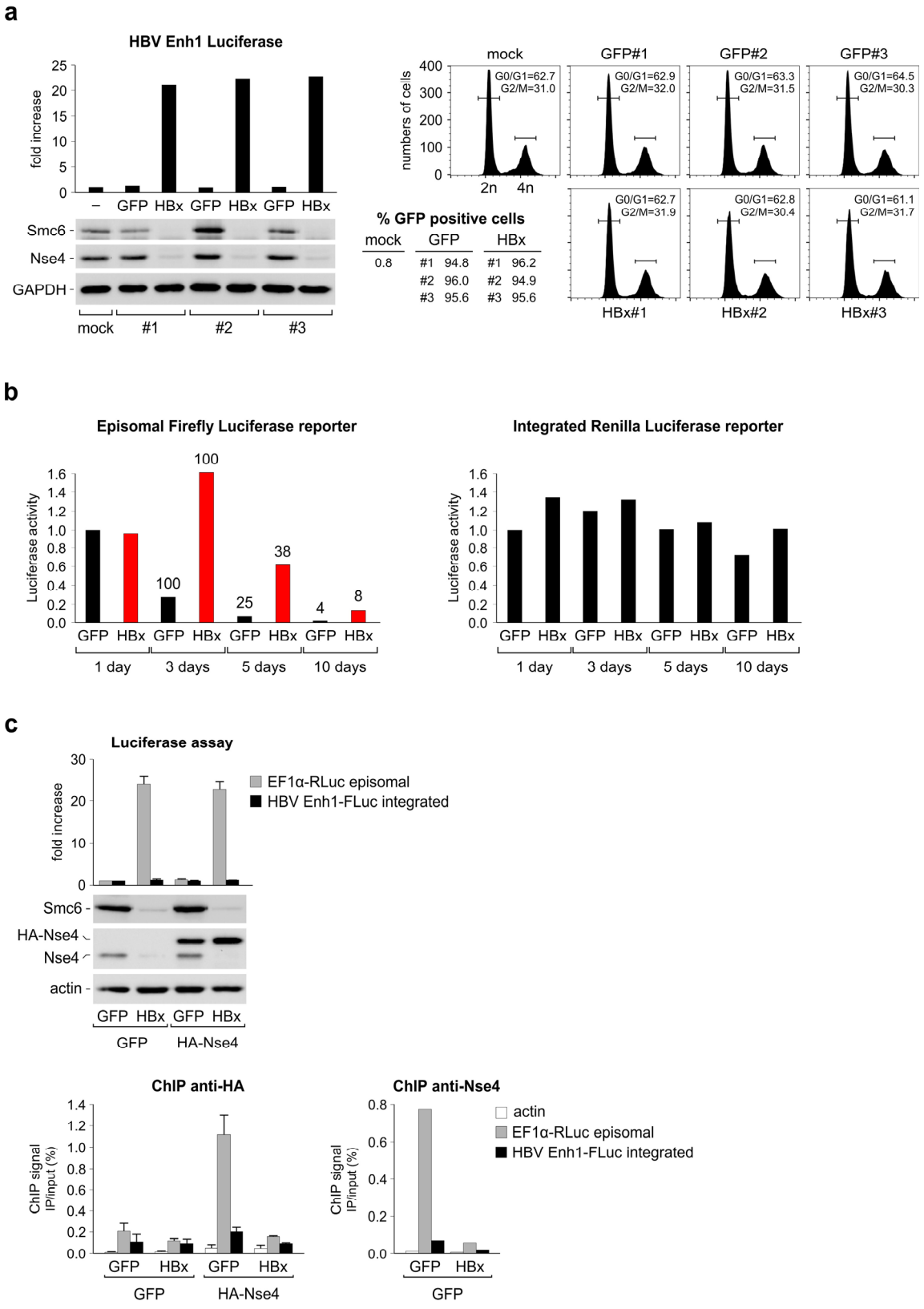


Extended Data Figure 2 | See next page for caption.

© 2016 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

Extended Data Figure 2 | HBx induces rapid depletion of the Smc5/6 complex by an MG132 proteasome inhibitor-sensitive pathway to stimulate extrachromosomal reporter gene activity. a, Same experiment as in Fig. 2a except that luciferase activity and Smc6 protein levels were monitored at the indicated time points after transduction of GFP or GFP–HBx. Luciferase activities are expressed in arbitrary units, with the fold increase in HBx-expressing cells relative to GFP control cells indicated on top. GFP–HBx was detected using anti-GFP antibodies. One out of two independent experiments. **b**, HepG2 cells were transduced with lentiviral vectors encoding GFP or GFP–HBx. Then, 16 h later, DMSO (control) or 10 μM MG132 was added to the culture to inhibit proteasome activity. Cells were harvested 8 h later and the level of the indicated proteins and of global ubiquitination was analysed by western blotting. GFP–HBx was detected using anti-GFP antibodies. One out of two independent experiments. **c**, The effect of the indicated viral proteins on Smc5, Smc6, and luciferase mRNA levels was determined by real-time RT–PCR. The values are relative to those measured in GFP-transduced cells, which were set to 1. **d**, Similar experiment as in Fig. 2b except that two concentrations of MLN4924 were used. **e**, Similar experiment as in Fig. 2c. **f**, Similar experiment as in Fig. 2d but with HepG2 cells containing the HBV Enhancer-I-driven firefly luciferase reporter gene (HBV-FLuc) integrated into the chromosome and an episomal *Renilla* luciferase construct driven by the CMV promoter (CMV-RLuc). Note that the shRNAs against Smc5 and Smc6 used in this experiment differ from those in Fig. 2d (see Methods). **g**, Same with the *Renilla* luciferase CMV promoter construct chromosomally integrated and a firefly luciferase reporter gene driven by the EF1α promoter episomal. Data in **c**, **f** and **g** represent the mean ± s.e.m. of three independent experiments.

© 2016 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

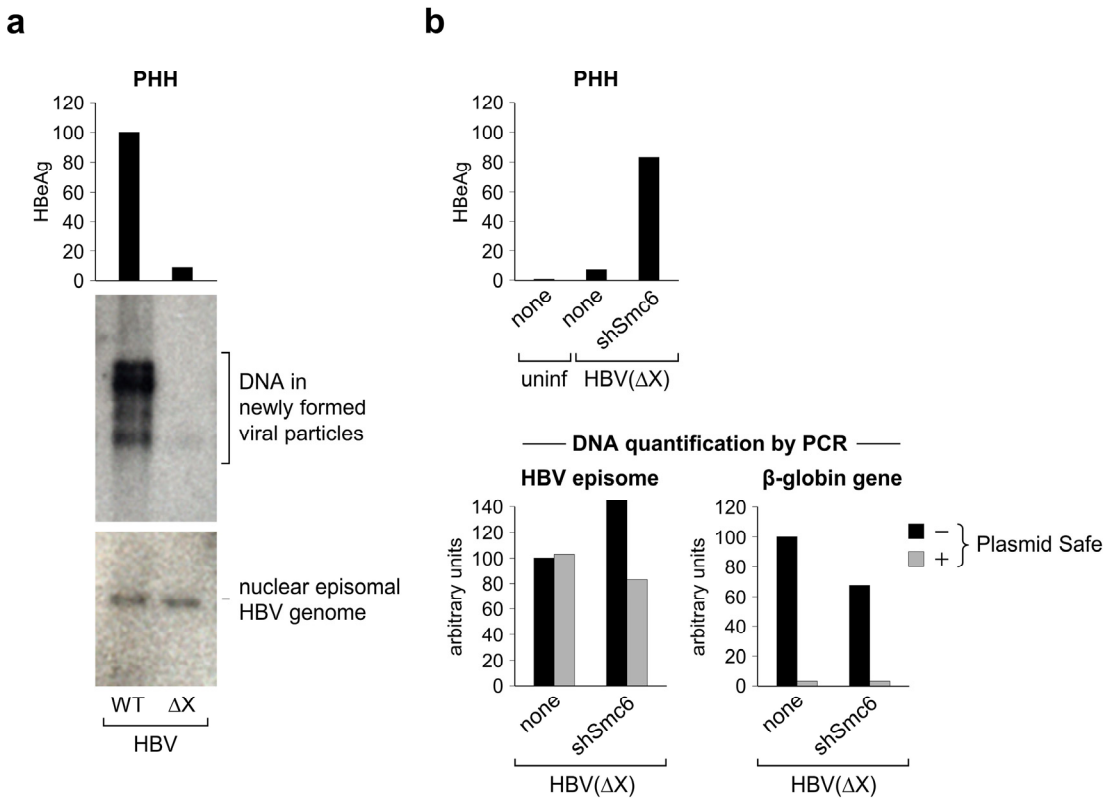


Extended Data Figure 3 | See next page for caption.

© 2016 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

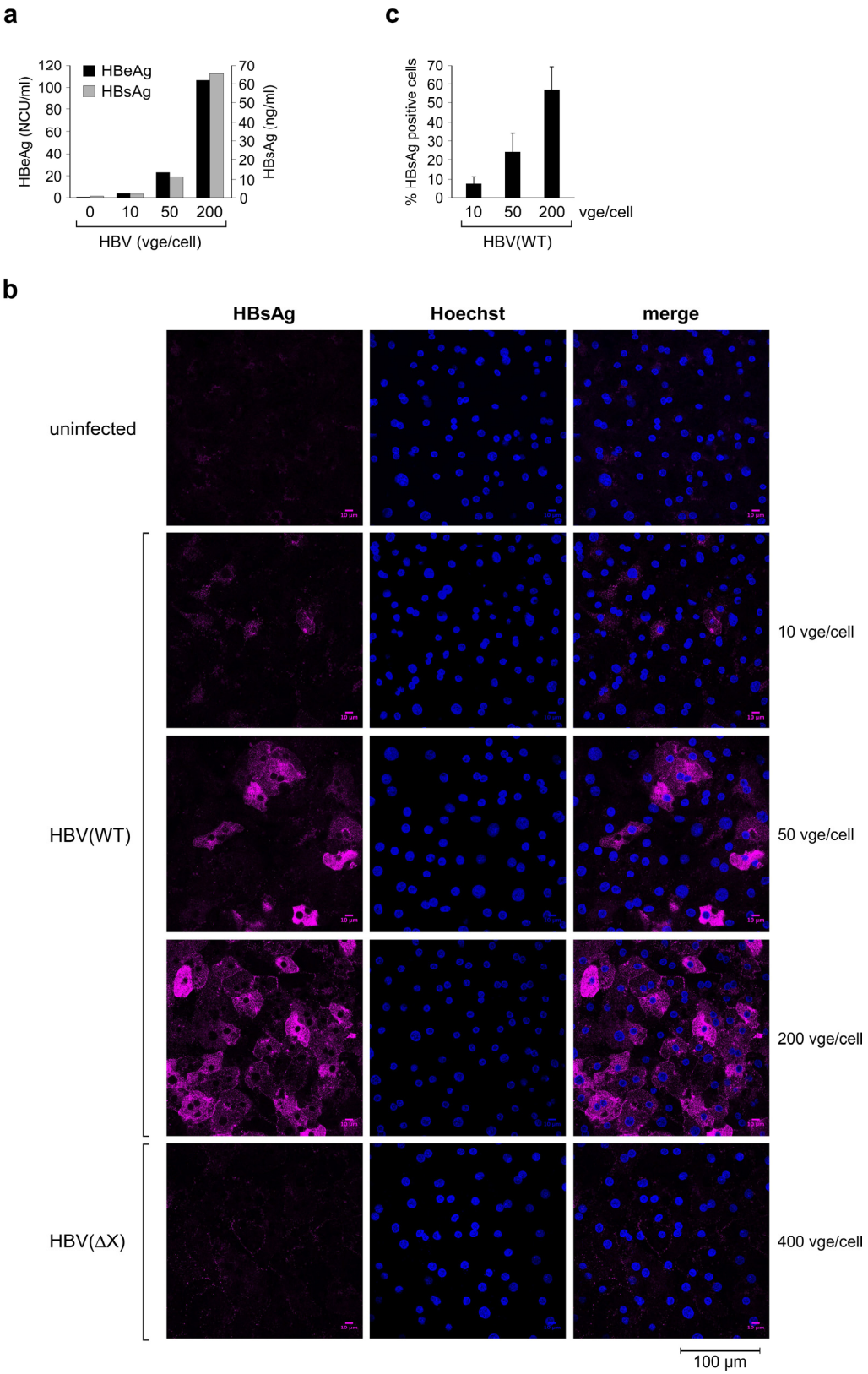
Extended Data Figure 3 | Smc5/6 degradation by HBx does not alter the cell cycle or promote chromosomal integration of the reporter but prevents the binding of Smc5/6 to the episomal DNA template. **a**, HepG2 cells were transfected with the HBV Enh1 luciferase reporter plasmid, split, and then either mock-transduced or transduced in triplicates with lentiviral vectors encoding GFP or GFP–HBx. Luciferase activity and protein expression (left panel) were monitored as in Fig. 2 at 5 days after transfection. In parallel, cells were analysed by FACS for GFP positivity (middle inset) and for DNA content (right panels) after propidium iodide staining. **b**, HBx does not promote stable integration of the reporter gene into chromosomes. HepG2 cells were transduced with a lentiviral vector to chromosomally integrate a *Renilla* luciferase reporter gene and subsequently transfected with a firefly reporter construct. Cells were then split equally and transduced with lentiviral vectors encoding GFP or GFP–HBx. Activity of the episomal firefly (left) and integrated *Renilla* (right) luciferase genes was monitored at the indicated time points after transduction of GFP or GFP–HBx. The values are expressed in arbitrary units relative to those measured at day 1 in the GFP control, which was set to 1.0. Indicated above the columns in the left panel is the remaining luciferase activity (expressed in per cent) relative to that measured 3 days after transfection. Note that in the absence of HBx (black bars in the left panel) the episomal firefly luciferase signal decreases rapidly with time, presumably because of loss of the reporter plasmid. In the presence of HBx (red bars in the left panel), the signal slightly increases to reach sixfold higher levels relative to the GFP control at 3 days after transfection, and then drops with kinetics close to that observed in the GFP control. In contrast, expression of the integrated *Renilla* reporter remains constant (right panel). This argues against HBx stimulating episomal reporter activity by promoting its integration into chromosomes. **c**, Left panels, the same ChIP experiment using anti-HA antibodies as in Fig. 2e but with HepG2 cells containing the HBV Enhancer-I-driven firefly luciferase reporter (HBV Enh1-FLuc) integrated into the chromosome and an episomal EF1α *Renilla* luciferase construct (EF1α-RLuc) as a control. Data represent the mean ± s.e.m. of three independent experiments. In one experiment, the unbound material from the indicated samples expressing no HA-tagged Nse4 was further purified using anti-Nse4 antibodies (lower right). Data are expressed as the percentage of input DNA recovered by ChIP. Note that in this experiment, the episomal reporter was delivered using an integrase-defective lentiviral vector[32].

© 2016 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved



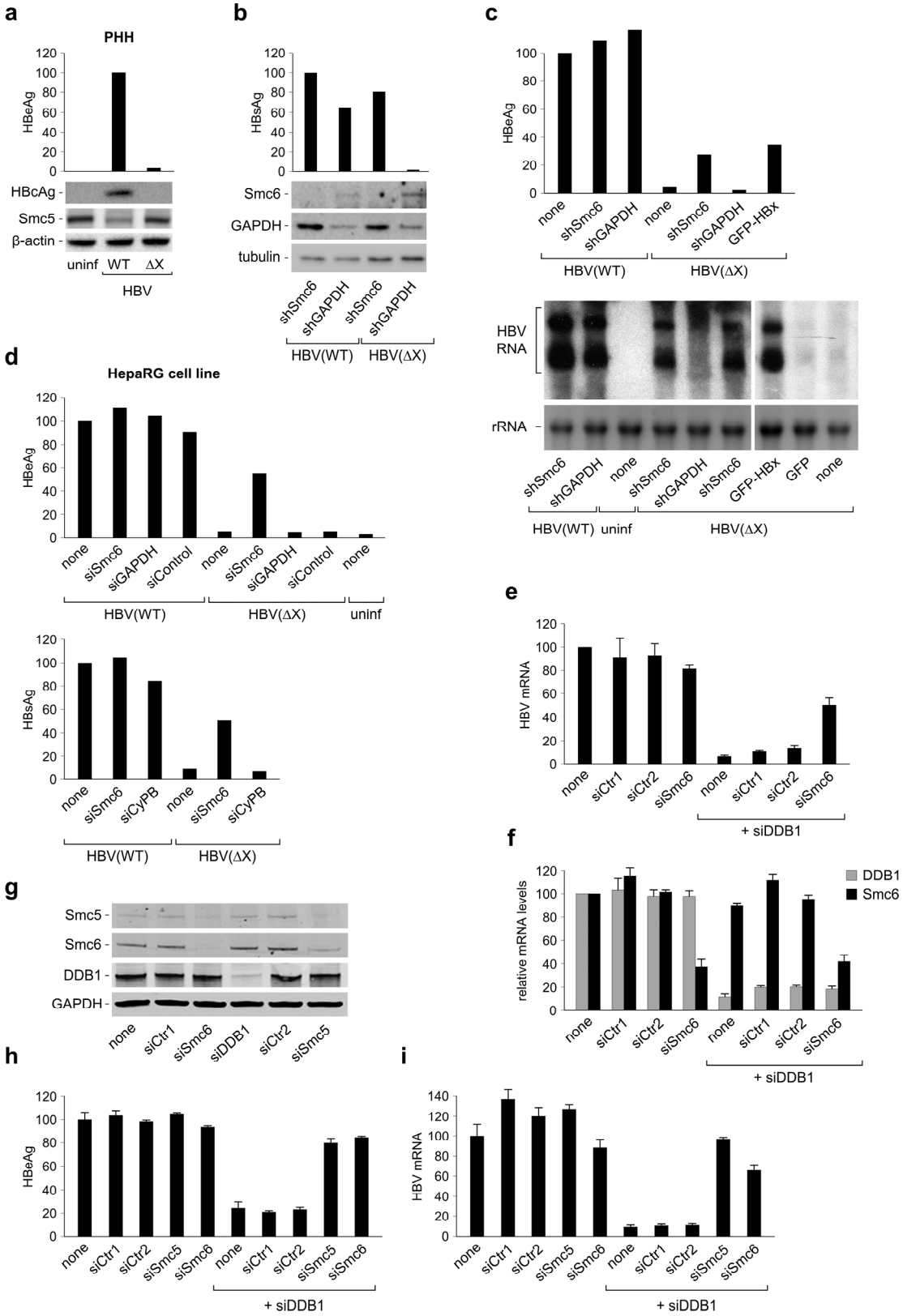
Extended Data Figure 4 | HBx or Smc5/6 knockdown does not affect HBV genome copy number. a, PHHs were infected with normalized stocks of wild-type (WT) or HBx-deficient (ΔX) HBV as in Fig. 3. HBeAg secretion (top) was assessed 10 days later by ELISA. In parallel, the amounts of cytoplasmic DNA replicative intermediates produced during reverse transcription of the viral pregenomic RNA (middle) and of the nuclear episomal HBV template extracted using a modified Hirt procedure (bottom) were analysed by Southern blot as reported[34]. **b**, PHHs were either mock transduced (none) or transduced with a lentiviral construct expressing an shRNA specific for Smc6 and the next day infected with HBx-deficient HBV particles (HBV(ΔX) as in Fig. 3c. HBeAg secretion was assessed 12 days later by ELISA (top). In parallel, the amount of nuclear HBV genome was quantified by real-time FRET–PCR[34] both directly or after treatment with Plasmid-safe DNase (Epicentre), an exonuclease that degrades single-stranded and double-stranded linear DNA but not the episomal HBV DNA (bottom left). Shown as a control for Plasmid-safe DNase treatment are the results for the chromosomal β-globin gene (bottom right).

© 2016 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved



Extended Data Figure 5 | Efficiency of PHH infection by HBV. **a**, Purified PHHs were either left uninfected (0) or infected with wild-type HBV particles at the indicated viral-genome equivalents per cell (see Methods). HBeAg and surface antigen (HBsAg) secretion into the culture supernatants was assessed 10 days later by ELISA. Concentrations are expressed in, respectively, national clinical units (NCU) per millilitre (HBeAg) and nanograms per millilitre (HBsAg) and were determined according to the manufacturers' guidelines (Autobio Diagnostics). The noise signals measured with the supernatants from the uninfected cells were 0.50 NCU ml^{-1} and 0.88 ng ml^{-1}. **b**, PHHs infected with normalized stocks of wild-type (WT) or HBx-deficient (ΔX) HBV at the indicated viral genome equivalents per cell were examined for HBsAg expression at 9 days after infection by indirect immunofluorescence confocal microscopy. Cell nuclei were stained with Hoechst dye (blue). **c**, Quantification of confocal images. Data are mean ± s.d. of at least three fields. Note that infection in Fig. 3 was with 200 viral genome equivalents per cell or more.

© 2016 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

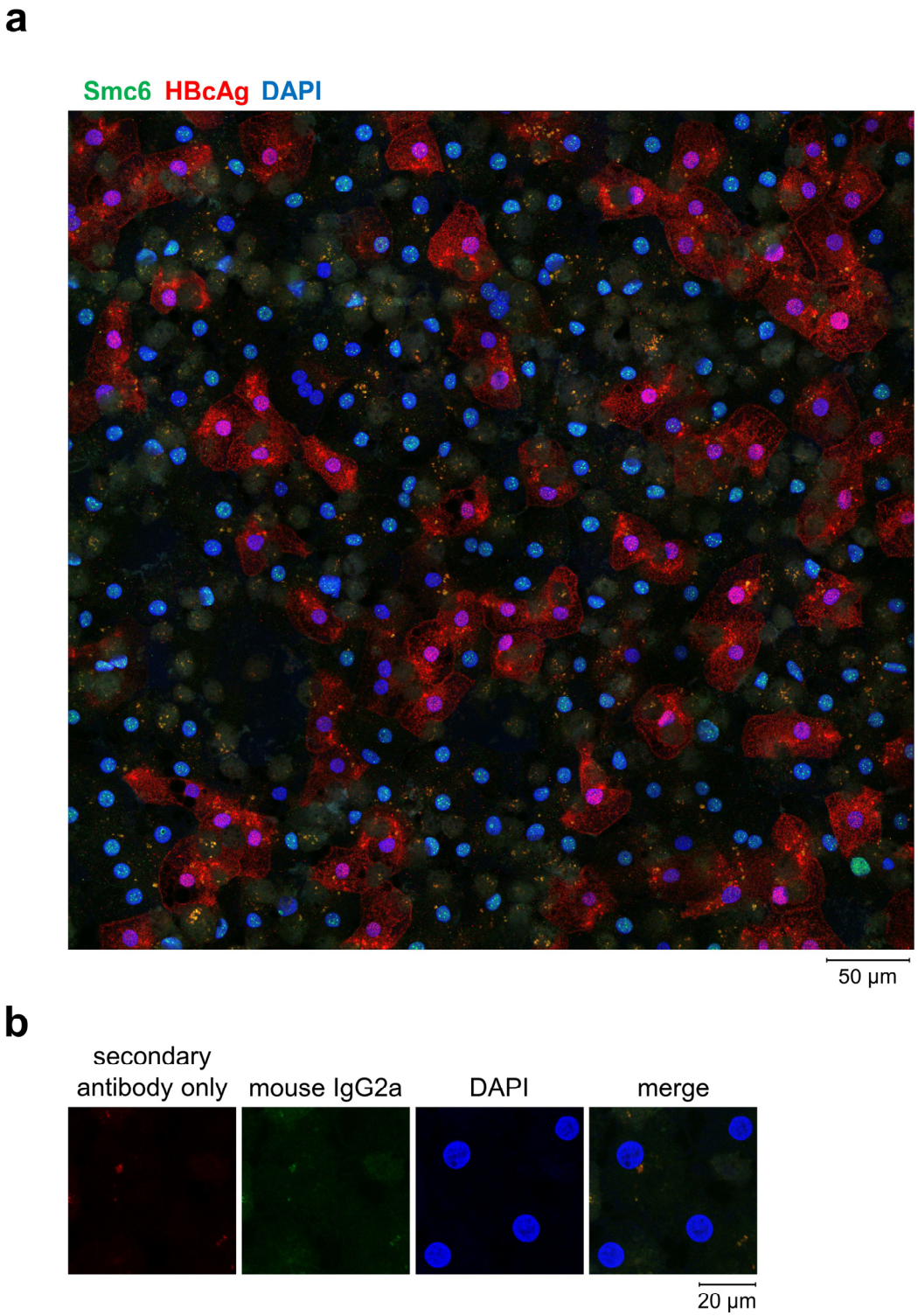


Extended Data Figure 6 | See next page for caption.

© 2016 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

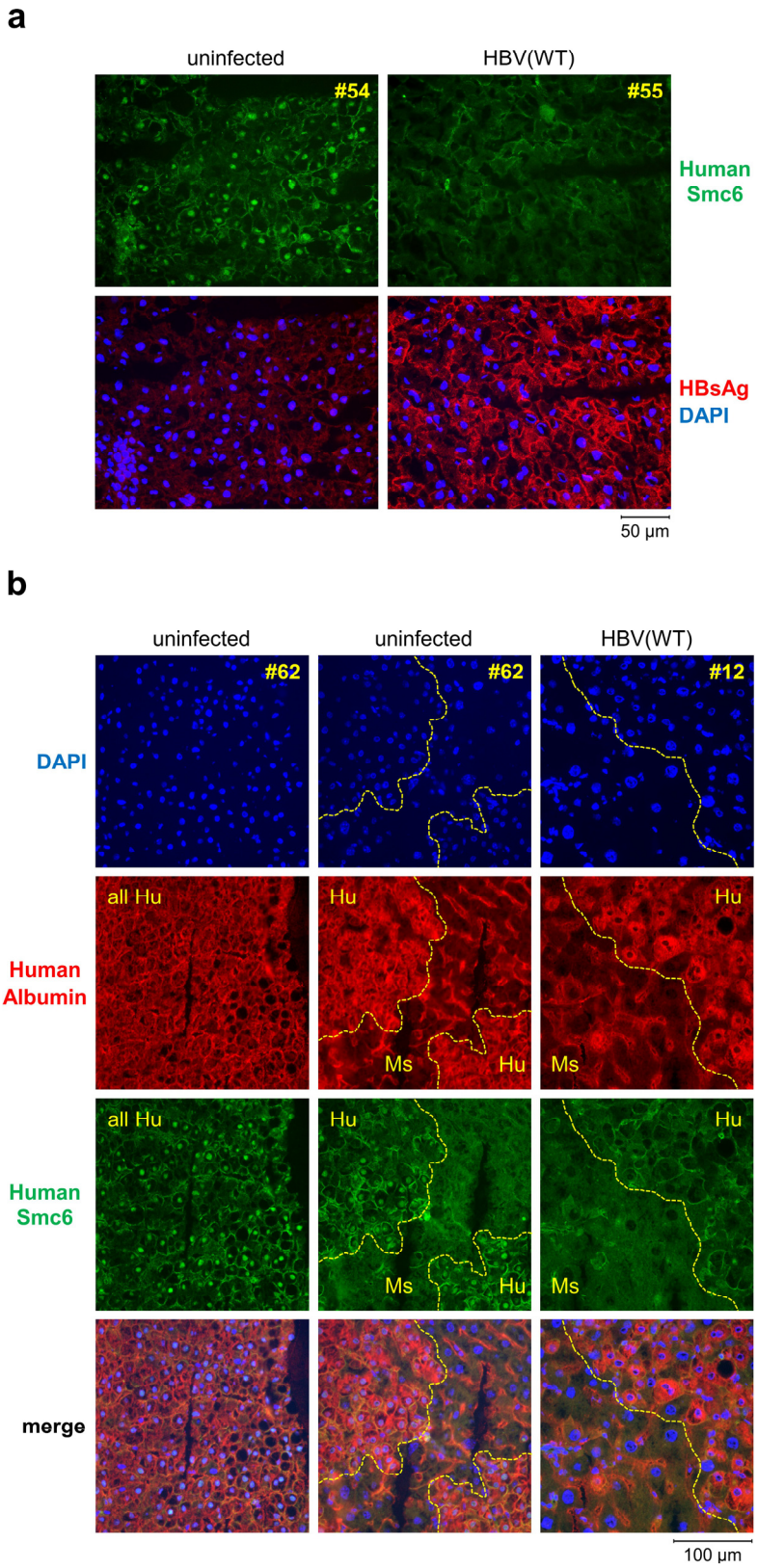
Extended Data Figure 6 | Silencing of Smc5/6 restores HBx-negative HBV transcription and rescues wild-type HBV on a DDB1 knockdown background. a, Biological replicate of Fig. 3a using PHHs from a different donor. **b**, Control for lentiviral shRNA-mediated depletion in PHHs. PHHs were transduced with lentiviral constructs expressing the indicated shRNAs and infected with HBV as in Fig. 3c. HBsAg secretion and the amounts of the indicated proteins were assessed 9 days later by ELISA and western blot analysis. HBsAg concentrations are relative to those measured in mock-transduced cells infected with wild-type HBV, which were taken as 100 (not shown). **c**, Independent northern blot analysis of HBV RNA production as in Fig. 3c using PHHs from a different donor. All lanes are from the same gel and exposure. Shown in the upper panel is the corresponding ELISA for HBeAg secretion. **d**, Smc5/6 silencing restores expression of HBx-negative HBV in HepaRG cells. Differentiated HepaRG cells were either left uninfected or infected with normalized stocks of wild-type (WT) or HBx-deficient (ΔX) HBV particles. Twenty-four hours later, cells were either mock transfected (none) or transfected with the indicated siRNA. HBeAg secretion was measured 10 days after infection by ELISA. The values are in arbitrary units relative to the wild-type HBV control, which was given a value of 100. Shown in the upper and lower panels are two independent experiments. CyPB, cyclophilin B. **e**, HBV mRNA expression. Total RNA was extracted from the samples analysed for HBeAg secretion in Fig. 3e. HBV mRNA levels were measured by real-time RT–PCR. The values normalized to β-actin are given in arbitrary units relative to those measured in mock-transfected cells, which were set to 100. Data represent the mean ± s.e.m. of $n = 4$ independent experiments performed with two different PHH donors. **f**, Control of siRNA efficacy. DDB1 (grey bars) and Smc6 (black bars) mRNA levels in Fig. 3e were measured by real-time RT–PCR and normalized to β-actin as in **e**. The values are given in arbitrary units relative to those measured in mock-transfected cells, which were set to 100. Data represent the mean ± s.e.m. of $n = 4$ independent experiments performed with two different PHH donors. **g**, Control western blot analysis of siRNA-mediated protein depletion. PHHs were transfected with the indicated siRNAs 3 days after plating. Protein levels were measured 10 days later. **h**, Data of one of the four experiments used in Fig. 3e that includes an siRNA targeting Smc5. Mean ± s.e.m. of triplicate measurements. **i**, Same experiment as in **h** but measuring HBV mRNA levels. Mean ± s.e.m. of triplicate measurements.

© 2016 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved



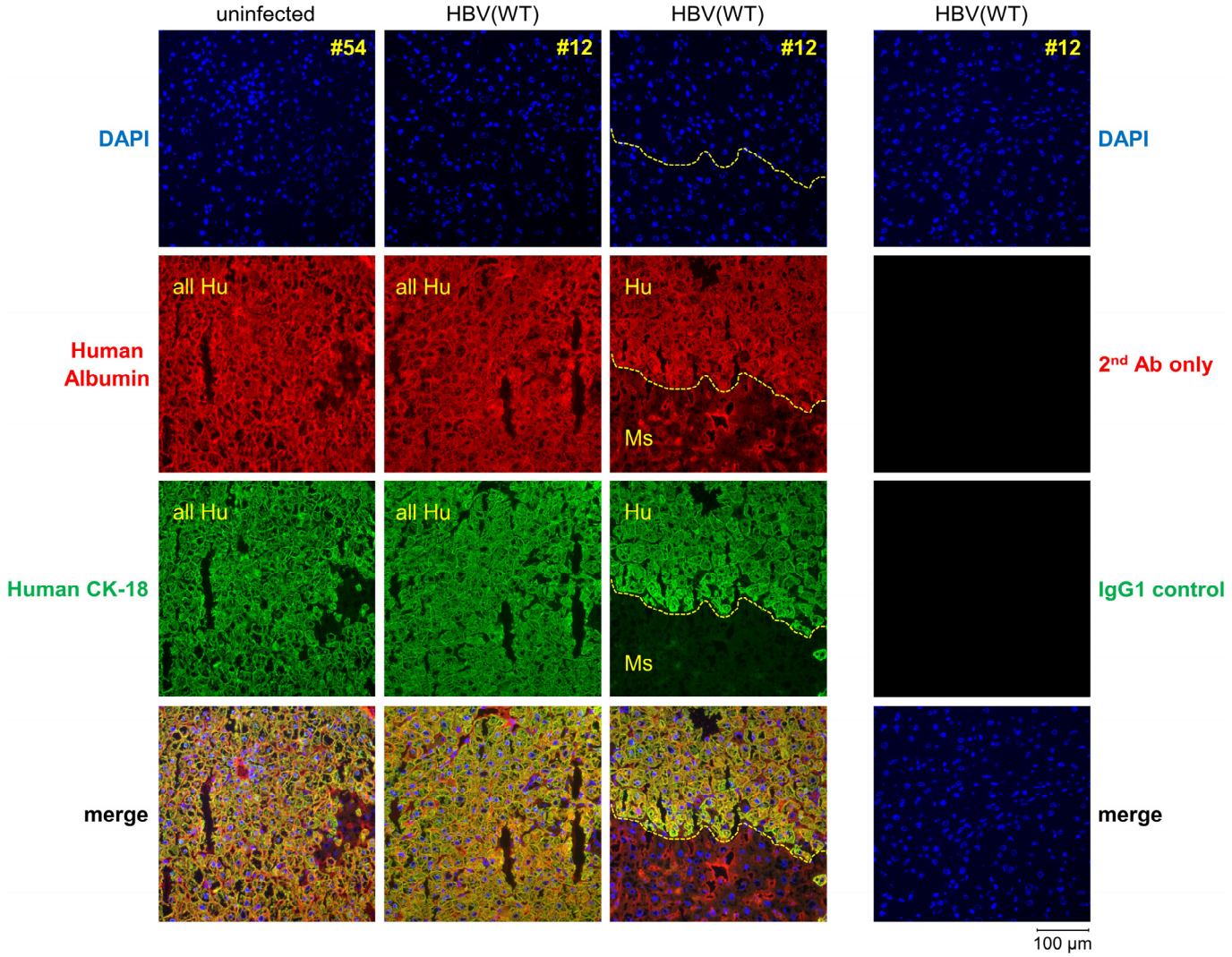
Extended Data Figure 7 | HBV infection induces Smc6 degradation in PHHs. a, Same as in Fig. 3b but 4 × 4 contiguous images were acquired and stitched together to produce a single image for examination of 200–300 PHHs. Shown are Smc6 (green), HBcAg (red), and DAPI (blue). **b**, Representative images of uninfected PHHs stained with mouse isotype-control-matched IgG2a primary antibodies or Alexa Fluor 488- and 594-conjugated secondary antibodies alone. Samples were imaged and processed as in Fig. 3b.

© 2016 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved



Extended Data Figure 8 | HBV infection induces Smc6 degradation in humanized mouse liver tissue. a, Same as in Fig. 4a but with different animal samples. **b**, Specificity of detection of human Smc6 in humanized mouse liver tissues. Fresh-frozen uninfected (animal 62) and infected (animal 12) humanized mouse liver tissues were stained with DAPI nuclear stain (blue) and with antibodies against human albumin (red) and human Smc6 (green). In the middle and right panels, a yellow dotted line delineates the interface between the human (Hu) and mouse (Ms) hepatocyte populations.

© 2016 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved



Extended Data Figure 9 | Human albumin and human cytokeratin-18 as markers for human hepatocytes in humanized mouse liver tissues. Fresh-frozen uninfected (animal 54) or infected (animal 12) humanized mouse liver tissues were stained with DAPI nuclear stain (blue) and with antibodies against human albumin (red) and human cytokeratin-18 (CK-18, green). A yellow dotted line delineates the interface between the human (Hu) and mouse (Ms) hepatocyte populations in the third column from left. Shown on the right are control staining of liver tissue from animal 12 with secondary antibody only or IgG1 isotype control.

© 2016 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

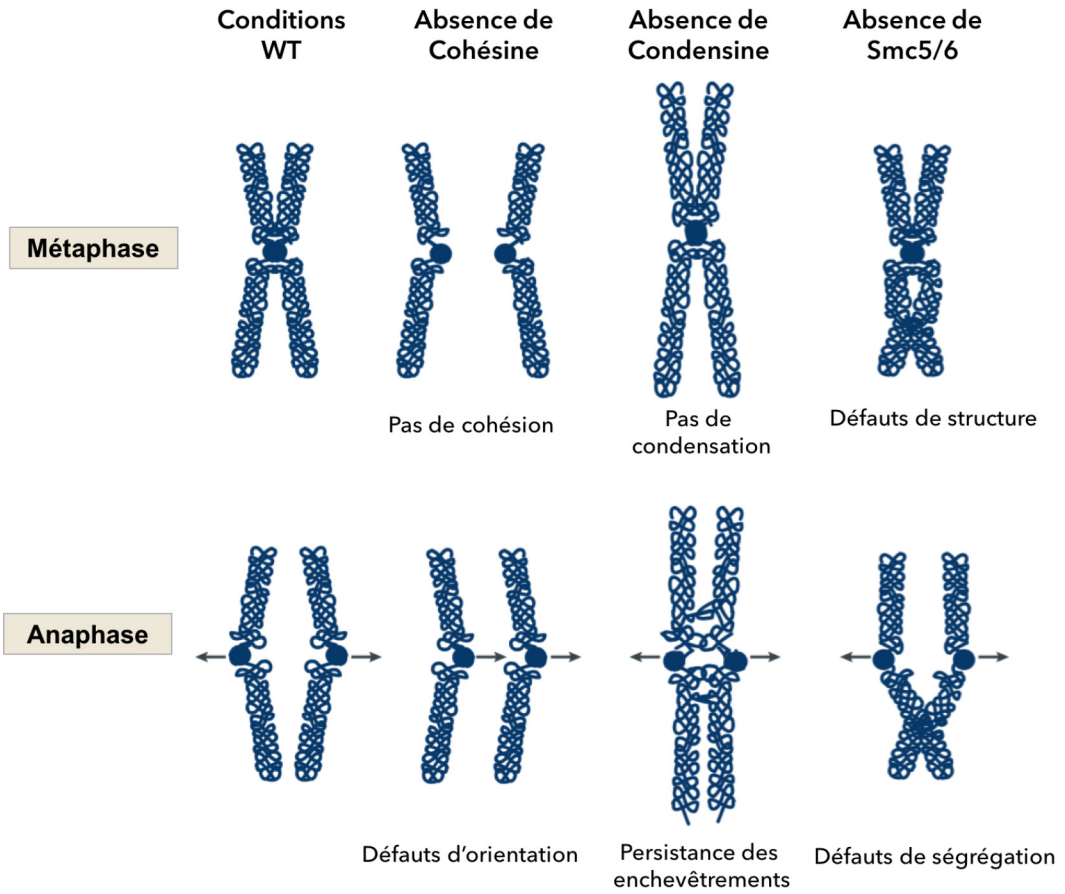


Figure 38 **Défauts de ségrégations des chromosomes observés en l'absence des protéines SMC.**

L'absence des protéines SMC engendre des défauts de cohésion, de condensation ou de structure au moment de la métaphase qui ont des répercutions au moment de l'anaphase.
Figure adaptée de [241]

VII.3. Discussion étude 2

L'ensemble de ces résultats montre que HBV utilise HBx pour dégrader un facteur cellulaire limitant sa capacité réplicative et que ce facteur cellulaire SMC5/6 agit comme un facteur de restriction.

La force de nos résultats repose sur la preuve que le complexe SMC5/6 est dégradé dans un contexte très physiologique d'infection de cellules *in vitro* (PHH et HepaRG). De plus, nous apportons une confirmation supplémentaire *in vivo* puisque que nous montrons la dégradation de SMC6 dans un modèle de souris avec foie humanisé infectées par un virus HBV WT.

Quelques temps après la publication de nos résultats, l'équipe de Murphy et al. a confirmé, dans un autre contexte cellulaire et via d'autres approches, la dégradation via le protéasome du complexe SMC5/6 par HBx [240]. En effet, l'utilisation de cellules HepG2 exprimant une protéine HBx tagguée, traitées par le MLN4924, pour bloquer le complexe E3 ubiquitine ligase, leur a permis d'identifier les partenaires de HBx. Ils ont ainsi confirmé que l'infection par HBV provoque la dégradation de SMC5/6. Nous avions au cours de mes travaux de thèse, utiliser l'approche du MLN4924 pour bloquer le complexe E3 ubiquitine ligase et ainsi inhiber la dégradation de SMC5/6 dans un contexte d'infection avec un virus sauvage. Cependant, le MLN4924 n'étant pas suffisamment spécifique nous avons été confrontés à une très forte variabilité dans nos résultats dans des PHH. En raison de ces forts effets secondaires, le MLN4924 ne peut pas être utilisé comme thérapie en l'état, mais peut apporter des pistes d'investigation.
L'équipe de Murphy est allée plus loin que nous dans l'étude de l'ubiquitination du complexe SMC5/6 confirmant ce que nous n'avions pas réussi à montrer clairement, à savoir la polyubiquitination des protéines SMC5 et SMC6 par le complexe CUL4/DDB1/HBx. Ils ont de plus démontré la spécificité de la dégradation de SMC5/6 car les autres membres de la famille SMC, la Cohésine et la Condensine, ne sont pas ciblés par le complexe E3 ubiquitine ligase [240].

On ne peut que remarquer que cette découverte tranche avec plus de 1000 publications consacrées à HBx au cours des 30 dernières années. Néanmoins, notre conviction à la suite de cette étude est donc que le rôle décrit ici pour HBx représente son rôle majeur et essentiel. En effet, lors de l'infection naturelle *in vivo* et *in vitro* par HBV, HBx est à peine détectable, que ce soit au niveau ARN et surtout au niveau protéique. C'est toujours dans ces conditions, même en utilisant des systèmes de transfection, que nous avons réalisé nos études. HBV se réplique uniquement dans le foie, donc essentiellement dans des hépatocytes différenciés ne se divisant pas. Dans ce contexte, HBx, exprimée en très petite quantité et ayant une demi-vie très courte, va, d'après nos résultats, en priorité interagir avec DDB1 et provoquer la dégradation de SMC5/6. Cela n'exclut pas que HBx puisse être exprimée en plus grandes quantités dans des conditions autres ; elle peut alors interagir avec d'autres partenaires nucléaires ou cytoplasmiques et être responsable d'autres effets divers mais secondaires (décrit en introduction) à son effet principal que nous décrivons dans cette étude.

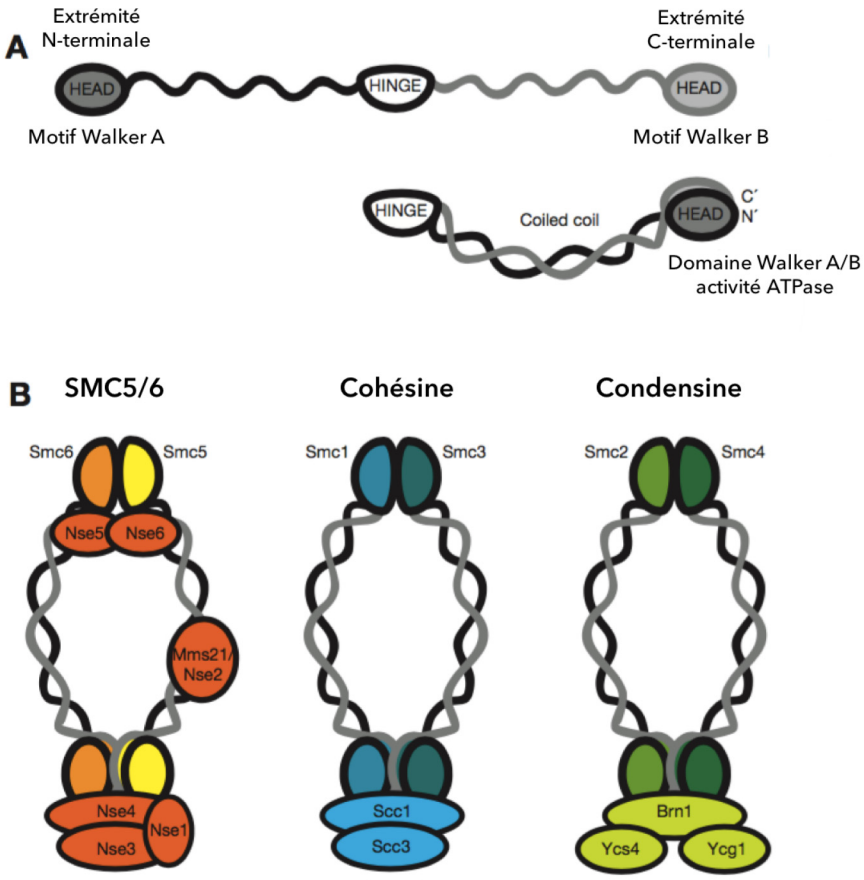


Figure 39 **Les membres de la famille SMC**

(A) Schématisation de la structure commune aux protéines SMC : deux motifs ATPase Walker A et B aux extrémités de la protéine, reliés par une queue de motif « coiled coild » et un domaine HINGE permettant le repliement de la protéine et la formation du domaine ATPase fonctionnel.
(B) Composition des trois hétérodimères de la famille des SMC, le complexe SMC5/6, la Cohésine formée par les protéines SMC1 et SMC3 et la Condensine composée par SMC2 et SMC4. Pour chaque complexe, les deux protéines SMC sont associées à des protéines NSE (non SMC element).
Figure adaptée de [242]

Ces résultats sont totalement originaux et permettent l'émergence de nombreuses questions et de nombreux points de discussion que je vais vous présenter dans la suite de ce manuscrit :

1) Qu'est-ce que le complexe SMC5/6 et quel est son rôle dans la cellule ?
2) La notion d'un facteur de restriction, bien que longtemps recherchée, est nouvelle pour HBV et pour SMC5/6. La possibilité que cette restriction ne se limite pas à HBV mais à tout ADN épisomal est nouvelle et ouvre de nouvelles pistes d'investigation.
3) Les mécanismes mis en jeu lors de cette restriction restent à découvrir : comment SMC5/6 favorise l'inhibition de la transcription ? Comment est dégradé SMC5/6 lors de l'initiation de la transcription (absence de HBx) ?
4) Enfin, quelle est la conséquence de la dégradation de SMC5/6 dans la cellule infectée ? Cette dégradation peut-elle expliquer la survenue des CHC ?

VII.3.1. Description du complexe SMC5/6

Le complexe SMC5/6 est décrit dans cette deuxième partie de mes travaux pour la première fois en tant que facteur de restriction participant à l'immunité intrinsèque de la cellule.

VII.3.1.a. La famille des SMC

Le complexe SMC5/6 fait partie d'une famille de protéines, les SMC (Structural Maintenance of Chromosome), très conservée dans l'évolution. Ces protéines sont à la base de la conservation du génome car elles sont impliquées dans la ségrégation des chromosomes et la réplication du matériel génétique ainsi que dans les mécanismes de réparation et de transcription.

Il existe chez l'homme 6 SMC principales (SMC1 à SMC6), partageant une structure commune et s'associant en 3 hétérodimères : SMC1-SMC3 forment le complexe de la **Cohésine**, impliqué dans la cohésion des chromatides sœurs, SMC2-SMC4 forment le complexe de la **Condensine** impliqué dans la condensation des chromosomes et **SMC5-SMC6** forment un hétérodimère dont les fonctions connues n'ont pas permis de donner un autre nom à ce complexe au vue de son implication dans de nombreux processus, notamment la réparation et la réplication de l'ADN (FIGURE 39 B). Les mutations dans les gènes codant pour les protéines SMC entrainent des aberrations chromosomiques importantes et des défauts de ségrégation au moment de la mitose. (FIGURE 38)

Chaque SMC contient aux extrémités N-terminale et C-terminale un domaine globulaire contenant respectivement les motifs ATPase Walker A et Walker B. Ces deux extrémités sont reliées par une longue queue avec des motifs « coiled-coils ». Cette région est séparée en 2 par un motif en épingle à cheveux permettant le repliement de la protéine et la création d'un site ATPase fonctionnel par l'association des domaines Walker A et Walker B. (FIGURE 39 A)
L'hétérodimérisation se fait par les domaines « hinge ». Les complexes ainsi formés sont également associés à d'autres protéines dites non SMC (dans le cas de SMC5/6 : NSE1, NSE3, NSE4 et parfois NSE2). Parmi celles-ci, une protéine klésine (Scc1/ Rad21 dans le complexe de la Cohésine ; Bareen/CAP-H pour la Condensine ; NSE4 pour le complexe Smc5/6) permet de fermer la structure en V du complexe [241].

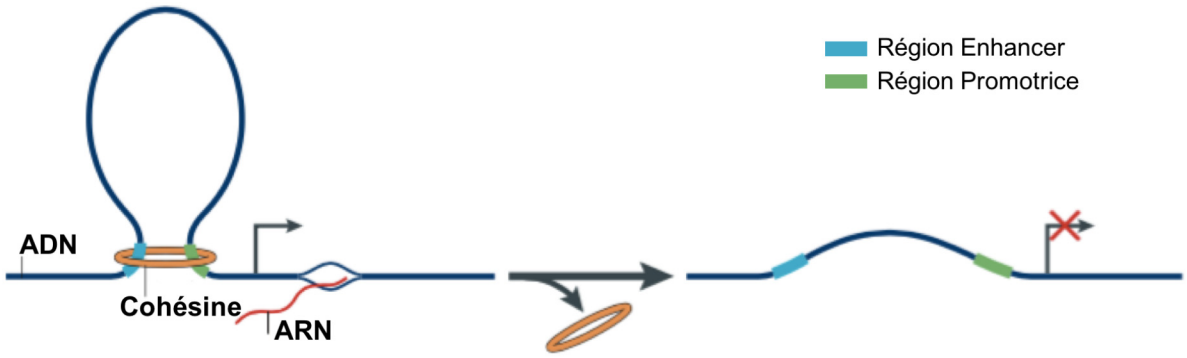


Figure 40 La cohésine participe à la régulation de la transcription

La cohésine permet de favoriser le rapprochement entre les régions enhancers et promoteurs et ainsi faciliter la transcription.
Figure tirée de [241]

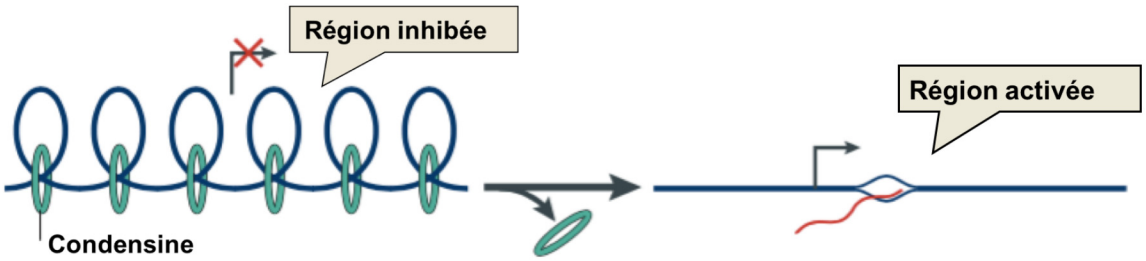


Figure 41 La condensine participe à l'inhibition de la transcription des gènes

Figure tirée de [241]

VII.3.1.b. Cohésine et Condensine

Cohésine

Le rôle principal de la Cohésine est son implication essentielle pour la cohésion des chromatides sœurs via une fonction de linker inter-molécules d'ADN. L'attachement des chromatides est nécessaire pour une ségrégation correcte des chromosomes au moment de la mitose. (FIGURE 38)

La cohésine est aussi impliquée dans la régulation de la transcription. En effet, elle permet de former des ponts intramoléculaires afin notamment de faciliter l'interaction entre les enhancers et les promoteurs. (FIGURE 40)

La Cohésine est également recrutée au niveau des lésions doubles brins de l'ADN. Son activité, permettant le rapprochement des chromatides, favorise la réparation par recombinaison homologue.

Condensine

La Condensine permet notamment, comme son nom l'indique, la condensation et le démêlage des chromatides sœurs afin de permettre leur séparation efficace au moment de l'anaphase. (FIGURE 38). Ce complexe, au contraire de la Cohésine, agit comme un linker intramoléculaire.

Parmi les autres fonctions attribuées à la Condensine on retrouve, comme pour la Cohésine, un rôle dans la régulation de la transcription des gènes de par sa capacité à inhiber la transcription (*gene silencing*). (FIGURE 41)

VII.3.1.c. Le complexe SMC5/6

Le complexe SMC5/6 humain est composé des deux protéines SMC5 et SMC6 associées en hétérodimère au niveau de leurs domaines HINGE et formant une structure en V. La protéine klésine NSE4, forme une sous unité avec NSE1 et NSE3, et s'associe avec les domaines HEAD des sous unités SMC. Ainsi le complexe SMC5/6 peut former un anneau capable d'entourer une molécule d'ADN.

Les protéines NSE associées peuvent apporter des activités enzymatiques au complexe :

- NSE1 contient un domaine RING similaire à celui des ubiquitines ligases, cependant aucune activité enzymatique n'a été rapportée pour cette protéine, même si la mutation de ce domaine affecte la croissance des levures et augmente la sensibilité aux dommages à l'ADN. Chez l'homme, NSE1 semble ubiquitinée et interagit avec NSE3 [243].

- NSE3 appartient à la famille des MAGE (melanoma-associated antigen). Elle peut d'ailleurs être retrouvée sous le nom de MAGEG1 chez l'homme [244]. Les protéines MAGE sont surexprimées dans certains types de cancers et leurs fonctions interviennent dans la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose et le développement neuronal.

- NSE4 est une protéine de la famille des klésines qui permet la fermeture du complexe SMC5/6.

- NSE2, n'est pas associée à la sous unité formée par NSE1, NSE3 et NSE4 et interagit avec SMC5 au niveau de son domaine coiled-coil. NSE2, contrairement aux autres sous-unités n'est pas nécessaire à la stabilité du complexe [244]. L'inhibition de l'activité SUMO-ligase par mutation affecte la sensibilité des cellules aux dommages sur l'ADN mais ne change pas les autres rôles du complexe SMC5/6. NSE2 possède une activité de SUMO-ligase qui semble jouer un rôle dans la stabilité du génome

VII.3.1.d. Le rôle du complexe SMC5/6

Etudié essentiellement dans la levure, le rôle du complexe SMC5/6 reste encore peu clair et soumis à controverse par rapport aux rôles bien définis de la Condensine et de la Cohésine. Le complexe SMC5/6 est impliqué dans de nombreux aspects permettant le maintien de l'intégrité du génome, tels que la réparation de l'ADN (rôle important dans la réparation des lésions doubles brins par recombinaison homologue), le contrôle des checkpoints cellulaires, les dernières étapes de la réplication de l'ADN et le maintien de la longueur des télomères. Certaines études rapportent également un rôle dans le *silencing* des gènes.
Dans l'ensemble, SMC5/6 partage de nombreuses fonctions avec les deux autres complexes SMC. SMC5/6 exerce ses fonctions directement, via son interaction avec l'ADN, soit via son interaction avec les complexes de la Cohésine et la Condensine.

SMC5/6 est essentiel à la prolifération cellulaire. L'inactivation du complexe conduit à la létalité des cellules dans la plupart des eucaryotes avec des exceptions en fonction de la lignée étudiée [245]/ Chez les souris homozygotes *Smc6-/-*, la mutation est létale au cours du développement embryonnique [246].
Dans certains modèles d'études, même en l'absence SMC5/6 les cellules sont capables de faire plusieurs cycles de division suggérant que la mort cellulaire pourrait être due à une accumulation de mutations [247].

VII.3.2. SMC5/6, facteur de restriction ?

VII.3.2.a. Qu'est qu'un facteur de restriction ?

Les virus sont des parasites intracellulaires et ils interagissent avec leurs cellules hôtes de deux façons :

- Tout d'abord en détournant la machinerie cellulaire pour leur propre compte de façon à les aider lors de différentes étapes de leur réplication (entrée dans la cellule, réplication du génome, intégration, bourgeonnement). Les protéines cellulaires mises en jeu sont donc des « cofacteurs » du virus.

- De plus, la cellule pour se protéger de l'infection met en place des mécanismes de défenses, une immunité intrinsèque, première ligne de défense de la cellule avec des facteurs de restriction qui vont tenter de restreindre l'infection virale.

Ces facteurs de restriction sont très divers de par leurs structures, leurs fonctions mais aussi les étapes de la réplication virale ciblée.

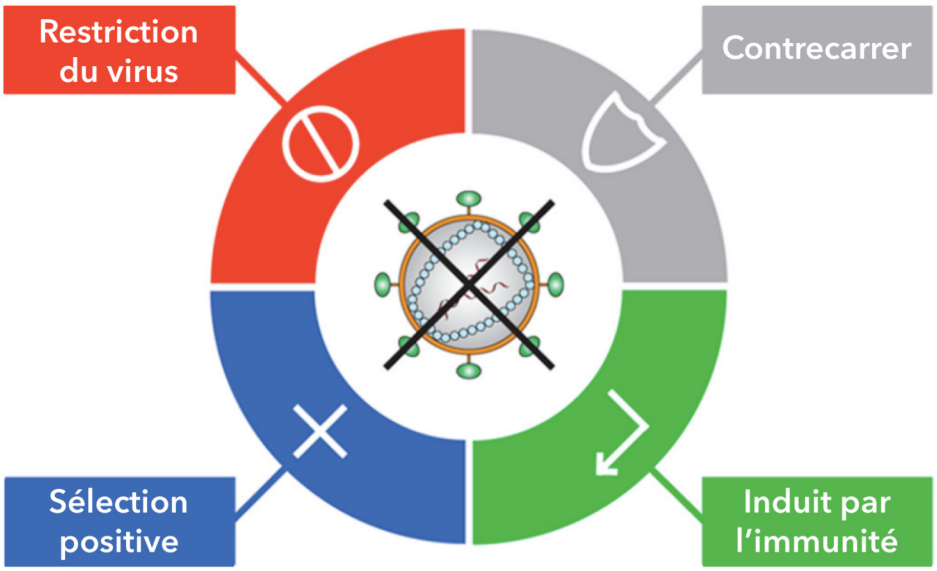


Figure 42 **Les 4 caractéristiques d'un facteur de restriction.**

Présentation des 4 marqueurs d'un facteur de restriction décrit par Harris et al. (1) permet la restriction d'un virus, (2) peut être contrecarré par un mécanisme viral, (3) être induit par l'immunité, (4) la séquence du gène est sous sélection positive à cause de son évolution rapide.
Figure adaptée de [248]

Il n'existe pas de définition précise du terme facteur de restriction mais ces protéines partagent des caractéristiques communes, notamment une expression ubiquitaire et constitutive dans presque tous les types cellulaires, une régulation possible par l'interféron et la plupart ont des d'autres fonctions cellulaires. Harris et al. [248] indiquent dans leur revue les 4 caractéristiques majeures d'un facteur de restriction tirées de l'exemple du virus HIV (FIGURE 42) :

1. Un facteur de restriction permet directement et fortement de diminuer l'infectivité du virus.
2. Le virus a développé un mécanisme pour contrecarrer le facteur de restriction. Grâce à lui le virus est capable de se répliquer même en présence du facteur de restriction.
3. Un facteur de restriction est fortement lié à la réponse immunitaire. Il peut donc être surexprimé par l'activation des voies de l'INF.
4. A cause de l'interaction protéine/protéine entre le facteur de restriction et la protéine d'échappement du virus, on retrouve généralement une signature d'évolution rapide dans la séquence du gène

En effet, au cours de l'évolution les virus ont acquis la capacité à lutter contre ses facteurs de restriction. Il existe 2 types de stratégies : (i) soit les virus échappent à la reconnaissance par la cellule hôte, via des mécanismes d'évolution et de mutation, (ii) soit ils ont développé des protéines antagonistes capables d'interférer avec le facteur de restriction.
Par conséquent, une course à l'armement a été mise en place entre les virus et les cellules hôtes au cours de l'évolution puisque chaque partenaire a évolué en fonction de leur interaction pour échapper ou maintenir la restriction. Ces phénomènes ont laissé une signature d'adaptation dans les séquences des gènes qui peuvent être suivies par des alignements de séquences. Ainsi il est possible de repérer les sites sous sélection positive[6] qui ont évolué rapidement au cours du temps, il s'agit des sites qui participent généralement à l'interaction entre le pathogène et la cellule hôte [249].

Finalement en dehors des marqueurs d'évolution, il est difficile de définir un facteur de restriction puisque comme le montre l'exemple du HBV, les virus sont capables d'interagir et de détourner un grand nombre de protéines cellulaires. La surexpression ou la dégradation de ces protéines nous informent sur l'effet antiviral de ces protéines. Mais peu d'entre eux ont été décrits comme de véritables facteurs de restrictions. Doyle et al. décrivent ces protéines aux effets antiviraux mais sans antagoniste viral connu ou mécanismes d'échappement du virus, plutôt comme des facteurs de résistance [250].
On peut donc dire qu'il est difficile de distinguer les protéines à effets antiviraux et les facteurs de restriction, mais la plupart des protéines intervenant dans les interactions virus hôte participent à l'immunité intrinsèque des cellules.

VII.3.2.b. Quelques exemples de facteurs de restriction

Le terme facteur de restriction a été mis en place dans les années 1970 avec la découverte du premier facteur de restriction, Fv1 qui protège les souris de l'infection par le MLV [251]. Plus tard, c'est chez les primates et les lentivirus tels que HIV-1 que l'on a pu identifier d'autres facteurs de restriction.

[6] Type de sélection et d'évolution naturelle qui promeut l'émergence d'allèles bénéfiques pour la cellule.

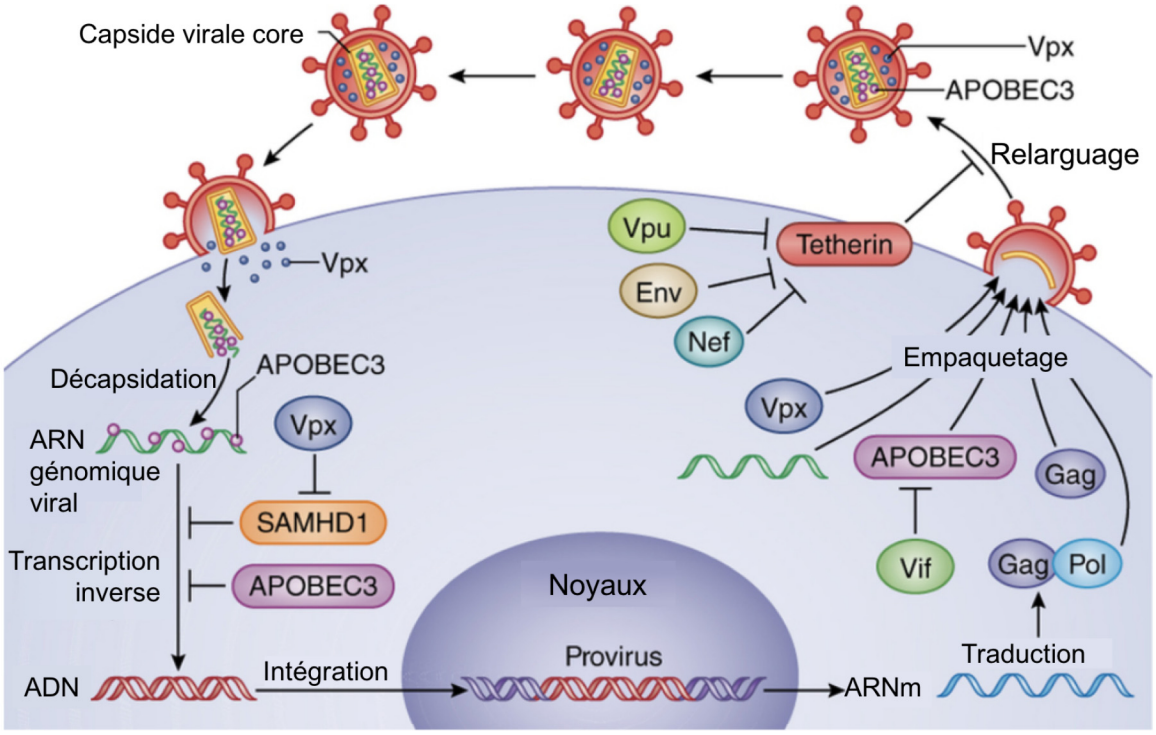


Figure 43 **Résumé du mode d'action des facteurs de restriction de HIV**

Figure tirée de [256]

Par exemple, TRIM5α est capable de bloquer la réplication des rétrovirus en inhibant la synthèse des ADNc viraux dans certaines espèces animales [249].

Les facteurs de restrictions les plus décrits chez les rétrovirus sont APOBEC3G, Tetherin et SAMHD1 dont les activités sont également retrouvées lors de l'infection par d'autres virus [248]. (FIGURE 43)

APOBEC3G est une cytosine désaminase qui est empaquetée dans la particule virale de HIV au moment du bourgeonnement. Lors de l'entrée dans la cellule cible, APOBEC3G inhibe la synthèse de l'ADNc viral en induisant des mutations G→A sur le génome viral bloquant ainsi la transcription inverse. Les protéines Vif de HIV-1 contrecarrent l'effet de APOBEC3G en provoquant sa dégradation par le protéasome avant son empaquetage dans les nouveaux virions [252].

Tetherin retient les nouveaux virions à la membrane de la cellule de par ses ancrages à la fois dans la membrane cellulaire et l'enveloppe des virus. Ce facteur de restriction à un effet antiviral à large spectre car de nombreux virus enveloppés sont soumis à son action tels que les *retrovirus*, les *filovirus* et les *herpesvirus* par exemple. La plupart des virus bloquent l'action de Tetherin avec une protéine de type Nef, HIV-1 utilise Vpu et HIV-2 la protéine Env. Ces protéines séquestrent le facteur de restriction hors de la membrane plasmique [253].

Enfin SAMHD1 diffère des précédents facteurs de restriction car il n'interagit pas directement avec le virus. Son activité dNTP hydrolase permet de diminuer le taux de dNTP intracellulaire ce qui conduit à une diminution de la transcription inverse. Vpx de HIV-2 ou Vpr de SIV sont capables de lier SAMHD1 et de recruter un complexe Cul4-E3 ubiquitine ligase pour induire la dégradation de SAMHD1 [254, 255]. Il est intéressant de noter que, de la même façon que HBx agit comme un DCAF pour recruter SMC5/6 au sein du complexe DDB1/E3 ubiquitine ligase, Vpx ou Vpr entre également en interaction avec DDB1 pour recruter SAMHD1 au sein du complexe E3 ubiquitine ligase. La restriction virale engendrée par SAMHD1 est réservée aux cellules différenciées et non proliférantes [256]. Ainsi, la capacité de HIV-2 à se répliquer dans des cellules myéloides différenciées est due à son expression de Vpx, HIV-1 au contraire ne possède pas de gènes capables de contrecarrer le facteur de restriction SAMHD1 et ne peut donc pas se répliquer dans de telles cellules.

VII.3.2.c. Qu'en est-il de HBV ?

En dehors de SMC5/6, il n'existe pas de facteurs de restriction pour HBV capables de limiter de manière drastique la réplication du virus. Il existe pourtant plusieurs études qui ont cherché si les facteurs de restriction décrits précédemment et connus pour les rétrovirus pouvaient influencer la réplication du virus de l'hépatite B.

Les protéines APOBEC sont des enzymes cystidines désaminases de l'ADN simple brin connues pour leurs impacts sur la réplication de nombreux virus dont HIV. Les études sur APOBEC et HBV ont été les plus nombreuses et montrent que la surexpression de protéines APOBEC3 (dont APOBEC3B-C-G ou F) pourrait réduire la réplication du virus. Cependant les résultats semblent varier en fonction du modèle d'étude [257].

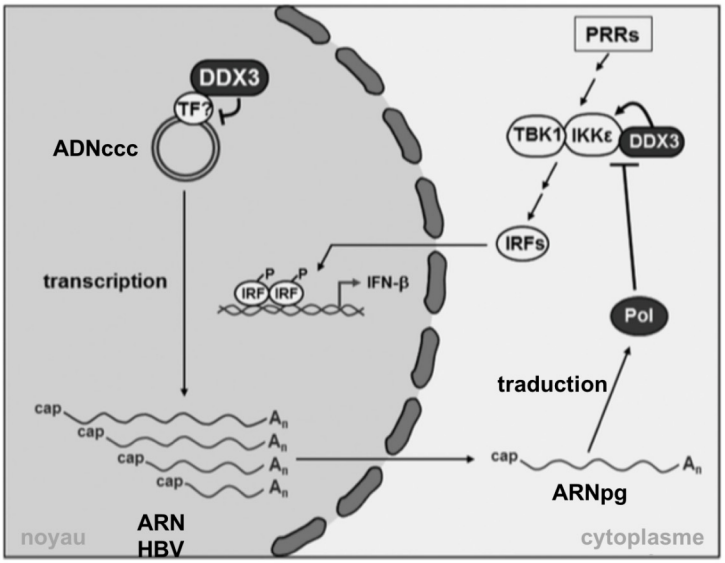


Figure 44 **L'action antivirale de DDX3 sur l'infection par HBV**

Dans le noyau, DDX3 bloque la transcription virale de l'ADNccc peut être via son interaction avec des facteurs de transcription. Dans le cytoplasme, DDX3 permet l'activation de la voie interféron, via les PRR et TBK1/IKKε, et inhibe ainsi la réplication virale. DDX3 est contrecarrée par la polymérase virale.
Figure tirée de [92]

En 2004, Turelli et al. ont démontré que la surexpression d'APOBEC3G dans des HUH7 engendre une diminution du taux d'ADN viral HBV, mais n'affecte pas la transcription et la traduction des protéines virales [258]. Des hypermutations G→A peuvent être détectées dans l'ADN viral de patients [259] mais l'importance de cette restriction reste limitée et mal comprise du fait de la très faible expression des protéines APOBEC dans les hépatocytes.
En 2014, Lucifora et al. démontrent que l'utilisation de cytokines à des doses très élevées permet l'activation des voies de l'interféron ou de NF-κB et la dégradation de l'ADNccc via l'action des enzymes APOBEC3 [12]. En effet, la déamination de l'ADNccc par APOBEC3B et APOBEC3A conduit les résidus uraciles ainsi produits à être excisés et engendre la dégradation de l'ADNccc [260].

En ce qui concerne le facteur SAMHD1, son rôle potentiel dans la réplication de HBV a été étudié dans l'étude de Sommer et al. [261]. Ils ont démontré dans un contexte d'infection de HepG2-NTCP que SAMHD1 affecte la production d'ADN de HBV via son activité dNTPase. SAMHD1 pourrait donc agir en tant que facteur de résistance pour HBV mais les mécanismes sous-jacents ne sont pas démontrés.

D'autres protéines ont été décrites pour avoir un rôle dans la restriction du virus de HBV. DDX3 est un membre de la famille des hélicases de l'ARN à motif DEAD-box, impliquée dans le métabolisme des ARN messagers, la transcription, l'épissage et la traduction.
L'équipe de Ko et al. [92] a montré que DDX3 était capable d'interagir avec la polymérase virale et était impliquée dans l'inhibition de la réplication de HBV au niveau post-transcriptionnel. Cette observation, d'abord réalisée dans des modèles cellulaires inductibles pour l'expression de HBV a ensuite été confirmée dans un modèle d'infection de cellules HepG2-NTCP [92]. L'induction possible par l'interféron, ainsi que la présence d'une protéine virale capable de contrecarrer son action, font partie des caractéristiques des facteurs de restriction. Or, il a été montré que la signalisation par l'interféron favorise DDX3 et que celui-ci est contrecarré par la polymérase virale de HBV [92, 262]. DDX3 semble donc agir comme un facteur capable de restreindre l'infection par HBV en supprimant la transcription de l'ADNccc et en favorisant la réponse interféron. (**FIGURE 44**)

On voit que, pour tous les facteurs de restriction connus, les situations sont complexes et varient en fonction du niveau d'expression de la protéine selon le type de cellule, l'état de différenciation et la prolifération, mais aussi en fonction de la relation avec le système de l'immunité innée.

Le complexe SMC5/6 apparaît dans nos travaux comme un facteur de restriction de HBV, mais nous sommes encore loin de comprendre le rôle de SMC5/6 en tant que facteur de restriction.

Nos travaux montrent que SMC5/6 freine la transcription de tout ADN sous forme épisomale. Bien que cette observation ne fasse pas encore l'unanimité dans la communauté scientifique, on peut imaginer que d'autres virus voient leurs activités diminuées par l'action de SMC5/6. En dehors de HBV, d'autres virus sont capables de former un ADN circulaire dans la cellule, ce qui leurs permet notamment d'échapper aux mécanismes de réparation de l'ADN. Les virus à ADN sous forme linéaire dont, HSV1, KSHV, Ad, ou AAV forment des ADN circulaires après leur infection. On peut imaginer que ces ADN soient également ciblés par le complexe SMC5/6 et qu'il existerait des protéines virales capables de contrecarrer son action. L'étude

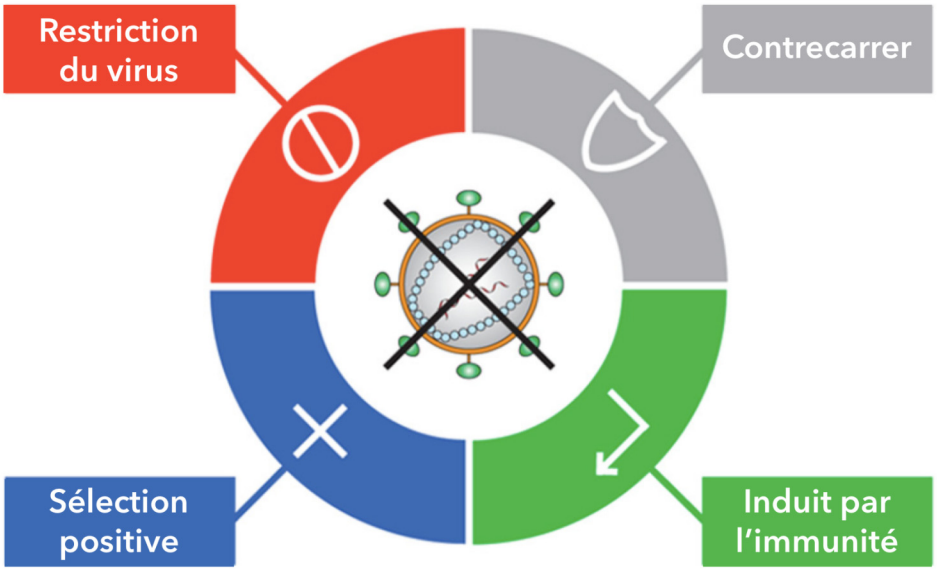


Figure 42 **Les 4 caractéristiques d'un facteur de restriction.**

Présentation des 4 marqueurs d'un facteur de restriction décrit par Harris et al. (1) permet la restriction d'un virus, (2) peut être contrecarré par un mécanisme viral, (3) être induit par l'immunité, (4) la séquence du gène est sous sélection positive à cause de son évolution rapide.
Figure adaptée de [248]

d'autres virus (HPV, HSV) et leurs interactions possibles avec SMC5/6 a été initiée dans d'autres laboratoires.

L'identification et la modélisation de la zone d'interaction directe entre HBx et SMC5/6 est également en cours dans le laboratoire de M. Strubin mais il s'avère que le complexe SMC5/6 est particulièrement difficile à étudier et à manipuler.

La définition d'un facteur de restriction comme décrit dans [249] implique une co-évolution de HBx et du complexe SMC5/6. En collaboration avec Lucie Etienne (ENS-Lyon) et Michel Strubin, nous avons pu aborder ces questions de co-évolution. Les premières approches montrent des sites de sélection positive sur SMC5/6, suggérant une compétition entre SMC6 et des facteurs exogènes au cours de l'évolution. Cependant ceux-ci ne semblent pas être affectés par la liaison avec HBx. Ceci suggèrerait que d'autres facteurs exogènes sont, au cours du temps, entrés en compétition avec SMC6. Ces travaux feront l'objet d'une publication prochaine dans laquelle je ferai partie des auteurs.

Il n'existe, a priori, pas de lien entre SMC5/6 et les mécanismes de l'immunité innée. Nous avons au laboratoire initié des approches avec de l'interféron qui d'après nos résultats préliminaires n'a pas d'effet visible sur la quantité de SMC5/6 ni sur l'activité de HBx. (données personnelles non publiées).

SMC5/6 respecte néanmoins deux caractéristiques principales d'un facteur de restriction (FIGURE 42), à savoir une inhibition totale du virus et une protéine virale intervenant pour contrecarrer les facteurs de restriction.

VII.3.3. Mécanismes mis en jeu lors de l'inhibition par SMC5/6

VII.3.3.a. SMC5/6 et inhibition de la transcription

En plus de son rôle connu dans la maintenance des chromosomes, le complexe SMC5/6 apparait d'après nos résultats comme capable de se lier à l'ADN viral en absence de HBx (figure 3f du papier) et ainsi de bloquer sa transcription. De plus, SMC5/6 semble capable de lier tous les ADN épisomaux quelles que soient leurs séquences (figure 2d de l'article et données supplémentaires). Cependant les mécanismes associés restent inconnus.

Plusieurs hypothèses peuvent être retenues et devront être explorées dans les études futures. Tout d'abord, la liaison entre SMC5/6 et l'ADNccc pourrait simplement bloquer l'accès de la polymérase et des autres facteurs de transcription [263].
SMC5/6 de par son implication dans les mécanismes de réparation de l'ADN est capable de reconnaître des structures particulières de l'ADN, il est possible que la transcription active d'un ADN épisomal soit reconnue par le complexe SMC5/6. Ainsi SMC5/6 pourrait se lier et bloquer l'ADNccc très rapidement après l'initiation sa transcription. L'étude de Lucifora et al. montrait d'ailleurs une transcription très faible et très rapide de l'ADN viral dans les premiers jours d'infection même en l'absence de HBx [76].

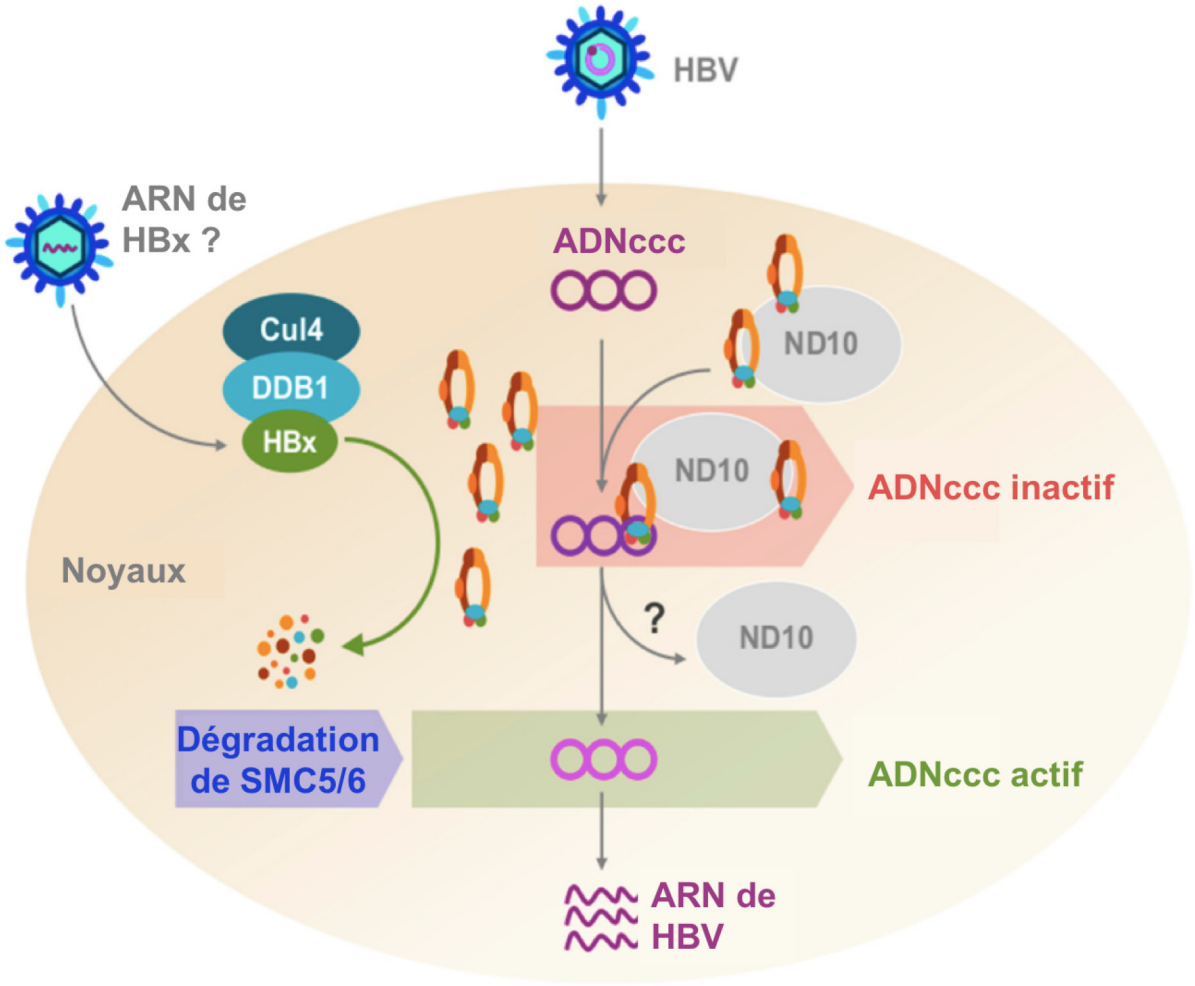


Figure 45 ***Modèle théorique pour expliquer le rôle de HBx et de SMC5/6 dans la régulation de la transcription de l'ADNccc.***

Lors de l'infection d'une cellule par le virus de HBV, l'ADNccc est ciblé par le complexe SMC5/6. Cette liaison pourrait permettre la séquestration de l'ADNccc dans les corps nucléaires ND10 et ainsi bloquer sa réplication. HBx permet de lever la répression de la transcription en conduisant SMC5/6 à sa dégradation. Les corps nucléaires ne semblent pas affectés par la dégradation de SMC5/6. En présence de HBx, l'ADNccc est actif et permet la transcription des ARN viraux.
Figure adaptée de [263]

SMC5/6 pourrait permettre le recrutement de facteur de remodelage de la chromatine entrainant la modification post traductionnelle des histones. On peut retenir dans cette hypothèse le rôle de la sous-unité NSE2 et son activité SUMO-ligase, il est possible de suspecter un rôle du complexe SMC5/6 dans le positionnement de la protéine NSE2 au niveau des régions de l'ADN qui nécessitent l'activité SUMO-ligase. La présence de protéine SUMOylées pourrait permettre le recrutement de facteurs de remodelage de la chromatine.

Enfin il est possible que l'interaction entre l'ADNccc et SMC5/6 et des composants cellulaires puisse conduire à la séquestration et l'inhibition de l'ADNccc. Les résultats récents de Niu et al. [264] montrent une colocalisation, dans les PHH, entre le complexe SMC5/6 et les protéines PML (promyelocytic leukemia protein) et Sp100 (speckled protein of 100 kDa), composants des corps nucléaires ND10 (nuclear domain 10 bodies) [264]. Ces corps nucléaires interviennent dans la séquestration et l'agrégation de protéines nucléaires et pourraient ainsi séquestrer l'ADNccc et bloquer sa réplication. (FIGURE 45)

Les corps nucléaires ND10 (ou corps PML) sont des structures nucléaires capables d'influencer la transcription génique. Leur implication dans la répression transcriptionnelle est suggérée par des études montrant la présence dans ces corps nucléaires de protéines impliquées dans la répression des gènes et le remodelage de la chromatine telles que HP1 (protéine que nous avons par ailleurs trouvé associée à l'ADNccc en l'absence de HBx, voir étude 1), ATRX ou hDaxx. Lors de phase de latence, le génome du virus HSV-1 est localisé au niveau des corps PML et des centromères des neurones [265], ce qui permet la régulation transcriptionnelle du virus [266]. La protéine ICP0 du virus induit de par son activité ubiquitine ligase la dégradation des composants des corps PML pour permettre la réplication du virus [237].

Les virus HSV-1 mais aussi de KSHV [267] ou le cytomégalovirus humain [268], dont les génomes à ADN sont ciblés et inhibés par les corps ND10 peuvent nous servir de modèle pour expliquer la restriction de l'ADNccc par SMC5/6.

VII.3.3.b. D'où vient HBx lors de l'initiation de la réplication ?

L'origine de la protéine HBx au moment de l'initiation de l'infection reste également en débat. En effet, la synthèse de l'ARNm de HBx nécessite la transcription de l'ADNccc mais en l'absence de HBx, cette synthèse est inhibée par SMC5/6. Il est possible d'imaginer plusieurs hypothèses : (i) Soit la transcription de HBx est très précoce ce qui permet une faible expression de HBx suffisante pour la dégradation de SMC5/6 ; (ii) Soit la particule virale infectieuse apporte lors de l'infection la protéine HBx ou de l'ARN messager codant pour HBx.
L'équipe de Niu et al. a déterminé que la dégradation de SMC5/6 est observée très précocement à partir du moment où la transcription de l'ADNccc commence, suggérant une expression de HBx très rapidement au cours de l'infection [264].
Ceci leur a été confirmé par une approche de séquençage de l'ARN (RNA-Seq) qui leur a permis de détecter des séquences de HBx seulement 24h après l'infection alors que le reste du génome semble exprimé seulement 2 jours post infection.
De plus, ils ont pu démontrer la présence de transcrits de HBx dans les particules virales isolées du surnageant de culture produisant des virions ainsi que dans le sérum de patients.

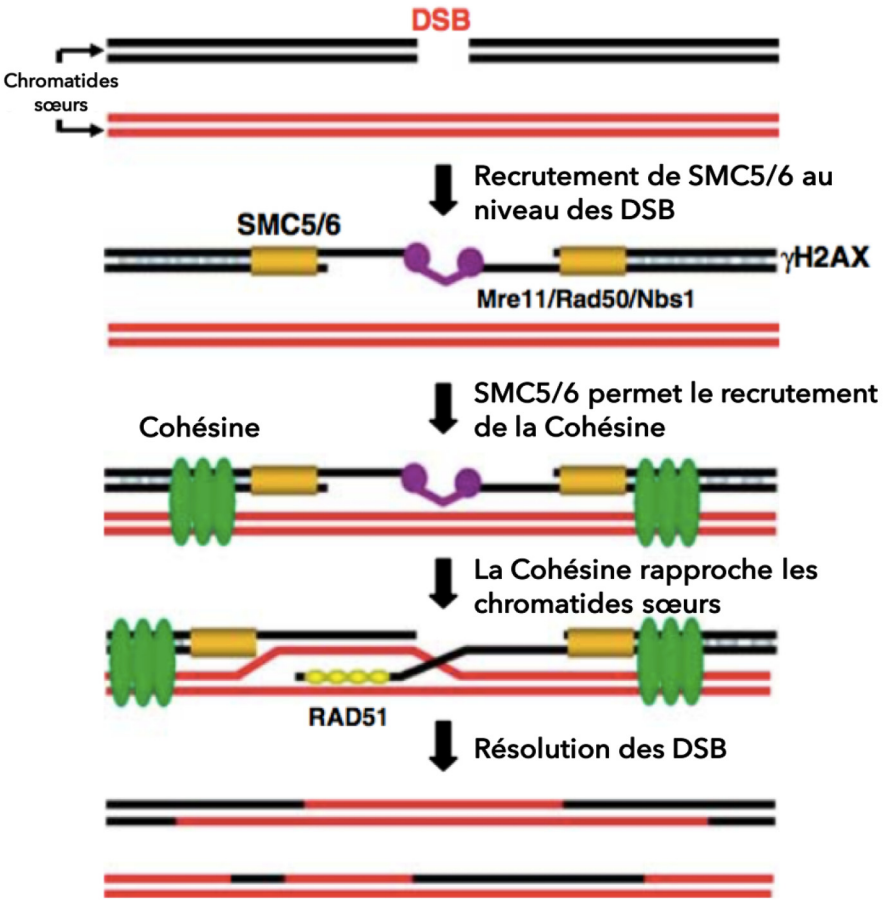


Figure 46 **Implication de SMC5/6 dans la réparation des lésions double brin.**

SMC5/6 permet la recombinaison homologue entre chromatides sœurs. SMC5/6 est recruté au niveau des lésions doubles brins et permet le recrutement du complexe de la Cohésine. La Cohésine permet le rapprochement des chromatides sœurs, ainsi la résolution des lésions peut avoir lieu via l'invasion et l'échange des brins. Le complexe MRN (Mre11/Rad50/Nbs1) est suspecté pour maintenir les extrémités simples brins libres et ainsi faciliter la réparation.
Figure tirée de [269]

Cependant, il n'est pour le moment pas déterminé si ces transcrits peuvent produire une protéine HBx fonctionnelle ni s'ils sont réellement empaquetés dans le virion à la manière de l'ARNpg. Cette hypothèse pourrait expliquer la dégradation de SMC5/6 à des temps très précoces si le virus apporte au moment de l'infection de l'ARN de HBx dans la cellule et est conforté par la découverte récente de particules subvirales ne comportant que de l'ARN viral. [39]

VII.3.4. Conséquences cellulaires de la dégradation de SMC5/6

Avant la publication de nos résultats, le complexe SMC5/6 n'était pas connu pour son rôle en tant que facteur de restriction mais plutôt pour sa participation, entre autres, aux mécanismes de réparation de l'ADN. Par conséquent, la perte de SMC5/6 lors de l'infection pourrait affecter les cellules hôtes notamment au niveau de leurs génomes.

VII.3.4.a. Les rôles connus de SMC5/6

Implication de SMC5/6 dans les mécanismes de réparation de l'ADN

Chez l'eucaryote, la réparation des cassures doubles brins DSB passe par 2 mécanismes principaux : la réparation par jonction des extrémités non homologues (NHEJ) et la recombinaison homologue (HR). La recombinaison homologue est possible notamment entre deux chromatides sœurs ou des chromosomes homologues.
Chez les mammifères, le cycle cellulaire détermine aussi le type de réparation utilisée. La recombinaison homologue est favorisée dans les phases S et G2 car elle requiert l'activité kinase dépendante des cyclines et surtout de la condensation des chromosomes. Au contraire, la NHEJ est utilisée lorsque les chromatides sœurs sont absentes donc en phase G1.

La mutation des différentes sous unités du complexe SMC5/6 rend les cellules hyper sensibles aux agents endommageant l'ADN tels que les UV, les radiations ionisantes, le méthyl methanesulfonate (MMS) ou l'hydroxyurée (HU). Ceci suggère donc une implication du complexe SMC5/6 dans les mécanismes de réparation de l'ADN [243].

Réparation des lésions doubles brins, SMC5/6 et HR

Lors de cassures doubles brins, une accumulation de SMC5/6 est observée au niveau des lésions ce qui permet le recrutement et l'activation de la Cohésine [269]. Ainsi SMC5/6 facilite la recombinaison homologue entre deux chromatides en permettant le rapprochement les chromatides sœurs. (FIGURE 46)
En l'absence de SMC5/6 et/ou de la Cohésine, les chromatides sont mal alignées ce qui perturbe la formation des jonctions de Holliday (HJ) nécessaire à la réparation de la lésion. L'activité de la Cohésine est dépendante sa SUMOylation par NSE2 [269]. En effet, la déplétion en NSE2 inhibe la recombinaison homologue observée entre deux chromatides sœurs.

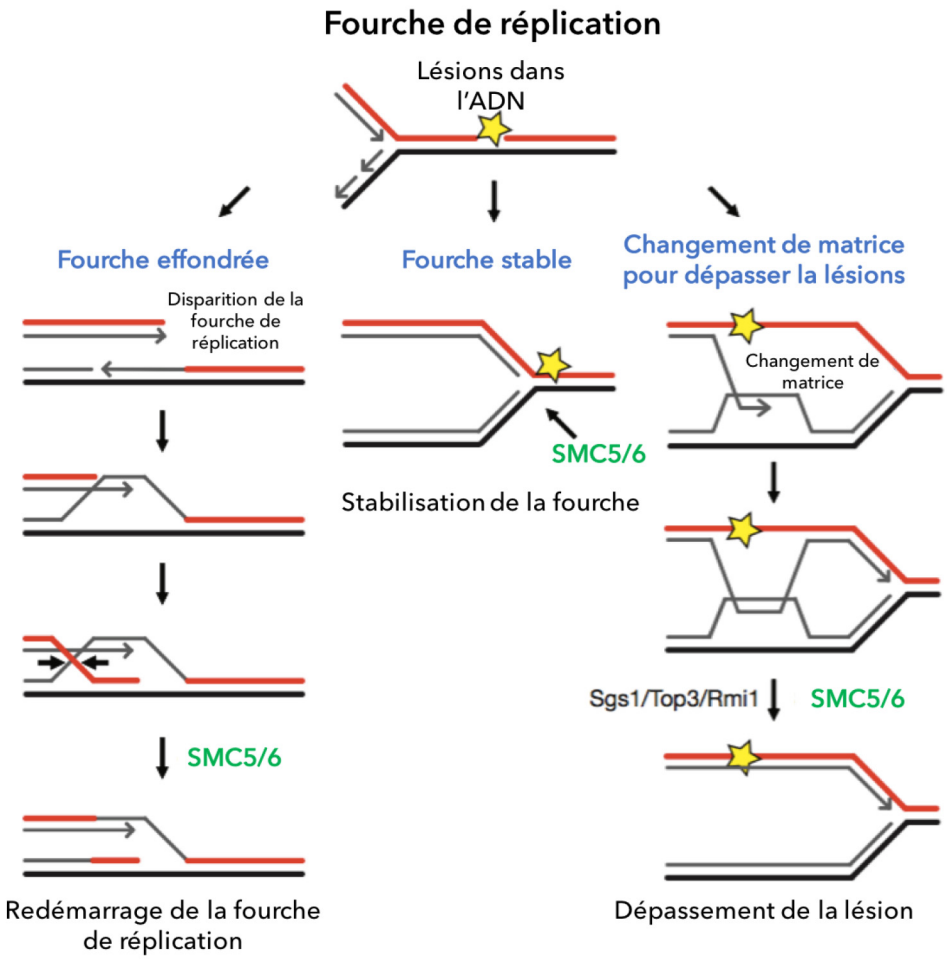


Figure 47 **Implication de SMC5/6 dans le maintein des fourches de réplication**

En cas de lésions sur l'ADN, la fourche de réplication a trois devenirs possibles : (i) Effondrement de la fourche, SMC5/6 permet de maintenir les brins d'ADN pour favoriser le redémarrage de la fourche ; (ii) SMC5/6 permet de maintenir la fourche stable malgré la lésion ; (iii) Changement de matrice pour dépasser la lésion, SMC5/6 permet déméler les brins d'ADN et ainsi redémarrer la réplication.
Figure adaptée de [269]

Fourches de réplication, SMC5/6 et HR

Lorsqu'une fourche de réplication rencontre une lésion sur l'ADN, celui-ci peut conduire à un effondrement de la fourche et à la formation de structure proche d'une cassure double brin. La réparation par recombinaison homologue permet de dépasser cette situation.
SMC5/6 intervient dans le processus de réparation en maintenant la fourche dans une conformation stable et compétente pour la recombinaison. La fourche de réplication peut ainsi passer outre la lésion via un mécanisme dépendant de la recombinaison homologue permettant le changement de matrice. [270, 271] (FIGURE 47)

Implication de SMC5/6 dans la maintenance des télomères

Il existe une voie alternative à la maintenance classique des télomères. Cette voie alternative (ALT pour Alternative Lengthening of Telomere) permet la régulation de la longueur des télomères en l'absence d'une télomérase active. Ce mécanisme permet alors à certaines cellules cancéreuses d'inhiber les processus de sénescence mis en place en l'absence de télomérase. Les mécanismes en jeux dans l'ALT dépendent des processus de recombinaison homologue. Des caractéristiques importantes permettent d'identifier une cellule utilisant le mécanisme ALT : la longueur variable des télomères entre les différentes cellules de la lignée et une localisation des télomères au niveau des PML. En effet, dans le cas de l'ALT, les télomères localisés dans les PML forment une structure appelée APB (ALT-associated PML bodies).
La caractérisation de ces APB, montre la présence de nombreuses protéines impliquées dans la réparation de l'ADN double brin au sein de ces structures telles que RAD51, RAD52, RPA, BRCA1 et le complexe MRN (MRE11, RAD50, NBS1), indispensable à la formation des APB.

Les études de Plotts et al. montrent que le complexe SMC5/6 est nécessaire pour la formation de ces structures APB. En effet, l'inhibition du complexe conduit à un raccourcissement des télomères et à une augmentation de la sénescence cellulaire dû à un défaut de recrutement des ALT au sein des PML [272].
La localisation des télomères dans les APB semble dépendante de l'activité SUMOligase de NSE2 au niveau des sous unités du complexe shelterin (TRF1 et TRF2) prenant en charge les télomères.

Ces études font écho aux observations de Niu et al. [264], SMC5/6 permet la localisation de l'ADNccc dans les corps PML, de la même façon que son implication dans la relocalisation des télomères au niveau des corps ABP. De plus, certaines études suggèrent que SMC5/6 permettrait de restreindre la liberté de mouvement des extrémités des cassures doubles brins et les recruter au niveau de régions spécialisées du noyau ainsi SMC6/6 pourrait jouer un rôle dans l'organisation nucléaire pour recruter les lésions doubles brins au niveau de régions spécifiques à la manière de la relocalisation des télomères au niveau corps PML.

Implication de SMC5/6 dans les dernières étapes de la réplication

La réplication induit un stress topologique dans la cellule, en effet lors de la séparation des 2 brins parentaux au niveau de la fourche de réplication, l'ADN plus en avant peut se retrouver super enroulé. Pour permettre une bonne duplication de l'ADN, ces super-

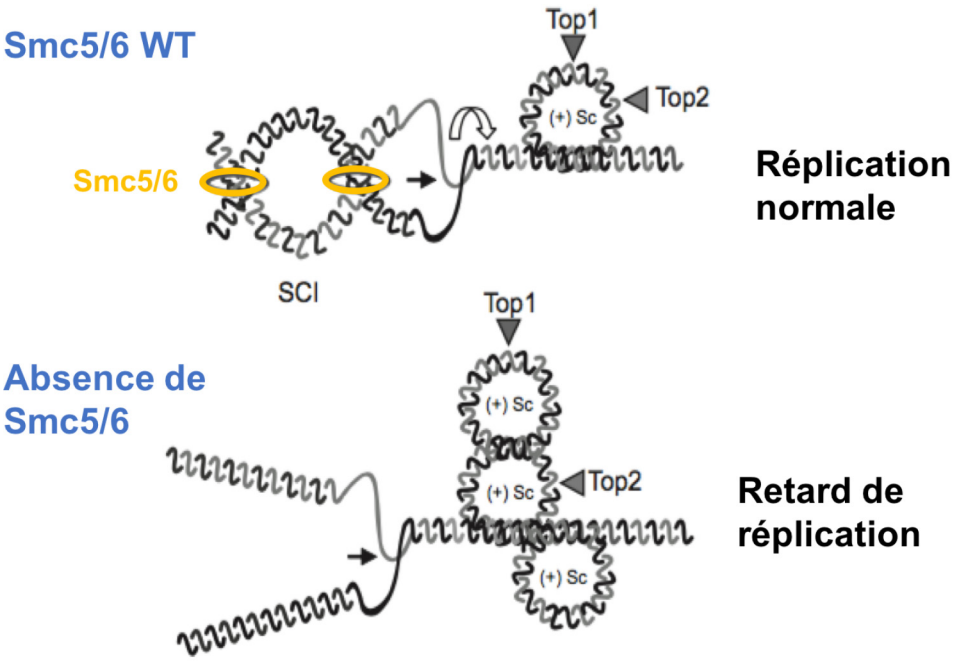


Figure 48 **Implication de SMC5/6 dans la réplication de l'ADN**

La rotation de la fourche de réplication dans le sens de la double hélice de l'ADN permet d'éviter l'accumulation de superenroulements de l'ADN lors de l'avancement de la fourche. Ce mécanime conduit à la formation de SCI (sister chromatid intertwinement). Les SCI sont maintenus par le complexe SMC5/6, en l'absence de celui-ci la réplication est ralentie.
Figure adaptée de [242]

enroulements doivent être éliminés. En général, l'intervention des enzymes topoisomérases de type I et II permet de réduire les tensions pour dérouler l'ADN en créant des cassures doubles brins transitoires.
Un autre moyen existe pour prévenir l'accumulation de ces superenroulements, il s'agit de permettre à la fourche de réplication d'avancer en tournant dans le même sens que la double hélice de l'ADN. Cependant ce mécanisme engendre la formation d'un entrelacement des chromatides sœurs (SCI- *sister chromatid intertwinement*) après le passage de la machinerie de réplication. Ce type de résolution à principalement lieu au niveau des sites de terminaison de la réplication, là où les 2 fourches de réplication se retrouvent ce qui limite l'accès aux topoisomérases à cause de l'encombrement stérique.

SM5/6 intervient dans ce processus en facilitant le maintien des SCI et ainsi favorise la rotation de la fourche de réplication [242]. (FIGURE 48)

Implication de SMC5/6 au moment de la mitose

Le complexe SMC5/6 prévient la fragmentation des chromosomes durant la phase de mitose. Stephan et al. démontrent qu'une mutation de SMC5 entraîne dans des cellules DT40 de poulet des anormalités mitotiques, à savoir par exemple, le retard de la séparation d'un ou plusieurs chromosomes, un mauvais attachement des chromosomes au fuseau mitotique, la présence de mitose multipolaire où des mitoses asymétriques ne partageant pas le matériel génétique convenablement [273].

Dans les cellules HeLa, la déplétion de SMC5 ou de NSE2 par RNA interférence conduit à la séparation précoce des chromosomes durant la phase de mitose due probablement à des défauts de cohésion [274].

Ce rôle de SMC5/6 semble lié à celui de la Cohésine. En effet, Outwin et al. observent une létalité des levures lors de la mutation de SMC6 due à une dérégulation de l'association entre la Cohésine et les chromosomes. En effet, la surexpression d'une protéase séparase Cut1, connue pour dissocier la Cohésine des chromosome, permet d'améliorer la survie des cellules [275].

VII.3.4.b. Conséquences de la dégradation de SMC5/6 par HBx

Le complexe SMC5/6 joue donc un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité du génome cellulaire. Dans une cellule infectée par HBV, la dégradation de SMC5/6 par HBx peut donc conduire à des défauts génétiques importants.

Devant l'implication évidente du complexe SMC5/6 dans les mécanismes de réparation de l'ADN, la perte de SMC5/6 pourrait prédisposer les cellules de l'hôte à l'accumulation d'erreurs génétiques engendrées par une accumulation de dommages sur l'ADN [276] que l'on sait nombreux dans un contexte d'infection chronique par HBV. Lors de l'infection chronique par le virus de HBV, les cycles de régénération cellulaire rapides entrainent des erreurs de réplication qui pourraient être favorisées par la perte du complexe SMC5/6.

De plus, puisque SMC5/6 est impliqué dans la maintenance des télomères, son absence lors de la présence de la protéine HBx favorise la sénescence, l'instabilité génétique et par conséquent l'oncogenèse.

La surexpression de HBx est connue pour affecter la phase S et ainsi perturber la ségrégation des chromosomes [198]. D'un autre côté, nous avons vu que SMC5/6 régule la réplication cellulaire au cours de la mitose en maintenant la structure des chromosomes [277]. Etablir un lien entre la dégradation de SMC5/6 par HBx et les conséquences de la surexpression de HBx est donc assez facile.

De plus, la réduction de l'expression de la protéine NSE2 du complexe SMC5/6 est associée à une augmentation de l'incidence au cancer chez les souris [278]. Sachant que la dégradation d'une des sous-unités du complexe déstabilise tout le complexe, la dégradation de SMC6 ou SMC5 par HBx conduit à la diminution du taux de NSE2.

Par conséquent et à la vue des différentes implications du complexe SMC5/6 dans de nombreux processus permettant le maintien de l'intégrité des chromosomes et du génome, la dégradation de SMC5/6 par HBx dans des cellules infectées pourrait conduire à l'apparition de défauts dans les cellules. La dérégulation de ces processus pourrait expliquer l'oncogénèse viro induite et modifier les processus de réparation des cellules infectées. C'est à partir de cette hypothèse que nous avons poursuivi mes travaux de thèse avec l'étude 3 présentée ci-après.

VIII. Travaux 3 : Implication de la dégradation de SMC5/6 dans les mécanismes de réparation de l'ADN.

Plan

VIII.2. Introduction 200
VIII.2.1. Les différentes voies de réparations de l'ADN 200
VIII.2.2. PARP 204
VIII.3. Résultats 210
VIII.3.1. L'absence de SMC6 altère la réparation des cellules à la suite de dommages à l'ADN causés par les radiations ionisantes 210
VIII.3.2. Le stress réplicatif engendré par le traitement à l'hydroxyurée est délétaire pour les cellules exprimant HBx 212
VIII.3.3. L'utilisation des inhibiteurs de PARP et le principe de la léthalité synthétique 216
VIII.3.4. Radiations ionisantes et inhibiteurs de PARP une combinaison au profit du traitement des CHC ? 220
VIII.4. Discussion 224

L'une des causes majoritaires du CHC est l'infection par le virus de l'hépatite B, or nous avons vu dans les travaux précédents de ce manuscrit que la présence de la protéine virale HBx dans les cellules conduit à la dégradation du facteur de l'hôte, SMC5/6. SMC5/6 est connu entre autres pour son implication dans les mécanismes de réparation de l'ADN.

Des publications antérieures démontrent que HBx est souvent exprimée dans les CHC humains d'origine HBV [207, 208]. Ainsi la dégradation du complexe SMC5/6 via la présence de la protéine HBx pourrait affecter les cellules tumorales infectées au niveau des voies de réparation de l'ADN, engendrant des défauts dans les voies de DDR (DNA Damage Response), cette modulation dans la DDR pourrait être exploitée à des fins thérapeutiques.

Pour répondre à cette hypothèse je vous présente dans la suite de ce chapitre, les derniers résultats non publiés que nous avons obtenus au sein de l'équipe démontrant que :

(i) Les cellules exprimant la protéine HBx, ou déplétées en SMC6, sont plus sensibles aux dommages à l'ADN causés par les radiations ionisantes
(ii) Le stress réplicatif engendré par le traitement à l'hydroxyurée est délétère pour les cellules exprimant HBx
(iii) L'utilisation des inhibiteurs de PARP (PARPi) pourrait être appliquée à des fins thérapeutiques via le principe de la létalité synthétique
(iv) Ces données ouvrent de nouvelles approches thérapeutiques quant à l'utilisation des PARPi et de la radiothérapie dans les CHC.

Vous trouverez en introduction une brève description des différentes voies de réparation de l'ADN et des dommages sur l'ADN engendrés par les radiations ionisantes ou le stress réplicatif. Enfin je vous présenterai une petite vue d'ensemble du fonctionnement des inhibiteurs de PARP (PARPi).

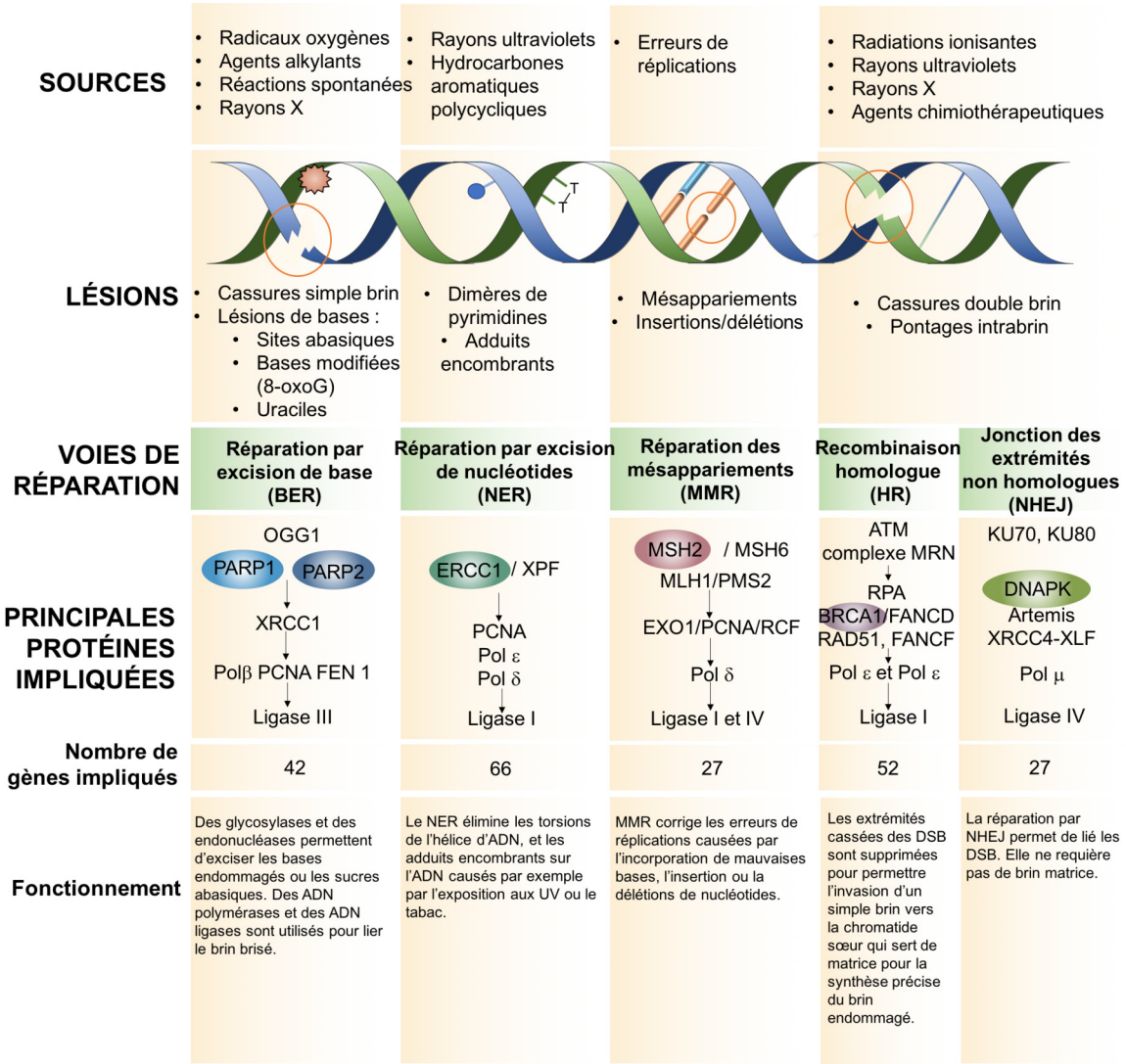


Figure 49 **Représentation des principales voies de réparation de l'ADN**

Différentes sources endogènes ou exogènes peuvent induire des dommages à l'ADN. La réparation des dommages est prise en charge par diverses voies de réparation. Les principales protéines impliquées sont représentées, ainsi que le nombre de gènes décrits pour leurs implications dans les voies de DDR d'après [279].

VIII.2. Introduction

VIII.2.1. Les différentes voies de réparations de l'ADN

L'intégrité du génome est soumise en permanence à des dommages endogènes ou exogènes. Le système de surveillance de l'ADN dans les cellules, le DDR, permet de repérer et de traiter les dommages à l'ADN de manière à éviter la formation et la transmission de mutations à l'origine d'instabilités génétiques.

Toute altération dans l'intégrité de la double hélice d'ADN constitue un dommage à l'ADN. Les origines des dommages à l'ADN sont multiples, provenant de sources endogènes comme les espèces réactives de l'oxygène produites par le métabolisme cellulaire, et par des expositions exogènes telles que des agents environnementaux, chimiques ou physiques comme les ultraviolets (UV) et les rayonnements ionisants (RI).
Les dommages à l'ADN peuvent prendre des formes multiples dont les plus connues sont : les pertes de bases, les dommages de bases, les cassures simple brin (SSB- *Single Strand Break*), les cassures double-brin (DSB - *Double Strand Break*), les pontages ADN/ADN et les pontages ADN/protéine. (FIGURE 49)

Les différents types de dommages de l'ADN sont pris en charge par des voies de réparations distinctes. Les cassures simples brins et les modifications de bases sont réparées par les mécanismes BER (Base Excision Repair) ou MMR (Mismatch Repair). Les lésions touchant à la conformation de l'ADN et affectant la double hélice, tels que les adduits sur l'ADN ou les dimères de pyrimidines sont pris en charge par le NER (Nucleotide Excision Repair) (FIGURE 49). Pour cela, les sites endommagés sont excisés, généralement avec les quelques résidus voisins, puis le brin lésé est réparé en utilisant le brin complémentaire comme matrice.

Les lésions les plus délétères pour la cellule sont les cassures doubles brins et leurs réparations peuvent être prises en charge par plusieurs voies. Le choix du mécanisme employé par la cellule est dépendant du cycle cellulaire. (FIGURE 50)

Il existe 3 voies majeures de réparation des cassures doubles brins :

- La recombinaison homologue (HR, *homologous recombination)*
- La voie canonique de jonction des extrémités non homologues (c-NHEJ, *non-homologous end joining*)
- La voie alternative de jonction des extrémités (Alt-EJ)

La réparation par c-NHEJ ou Alt-EJ consiste en la liaison des extrémités de l'ADN cassées sans utiliser de matrice de réparation, au contraire la réparation par HR permet l'échange des brins d'ADN afin de réparer un brin lésé en prenant la matrice complémentaire à celui-ci.
Il est important de noter que HR est un mécanisme de réparation très précis puisque la réparation prend pour matrice la séquence complémentaire à la séquence lésée. Cependant elle ne peut avoir lieu que lors des phases S et G2 lorsque les chromatides sœurs sont appariées. (FIGURE 50)
En revanche, le c-NHEJ même s'il peut intervenir à tous moments du cycle est source d'erreurs plus fréquentes dans la séquence de nucléotides nouvellement formée en raison de l'activité exonucléase mis en jeu.

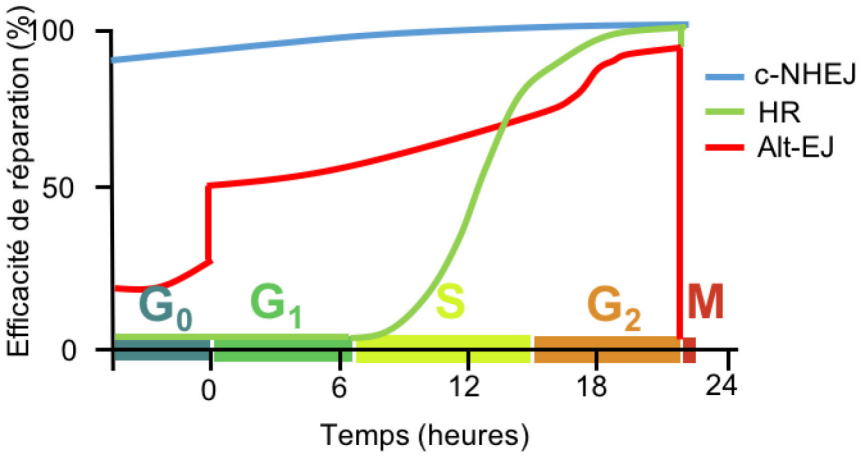


Figure 50 **Activité des principales voies de réparation des DSB en fonction du cycle cellulaire**.

Les trois voies impliquées dans la réparation des cassures doubles brins, c-NHEJ, HR et Alt-EJ sont régulées en fonction des phases du cycle cellulaire.
Figure tirée de [280]

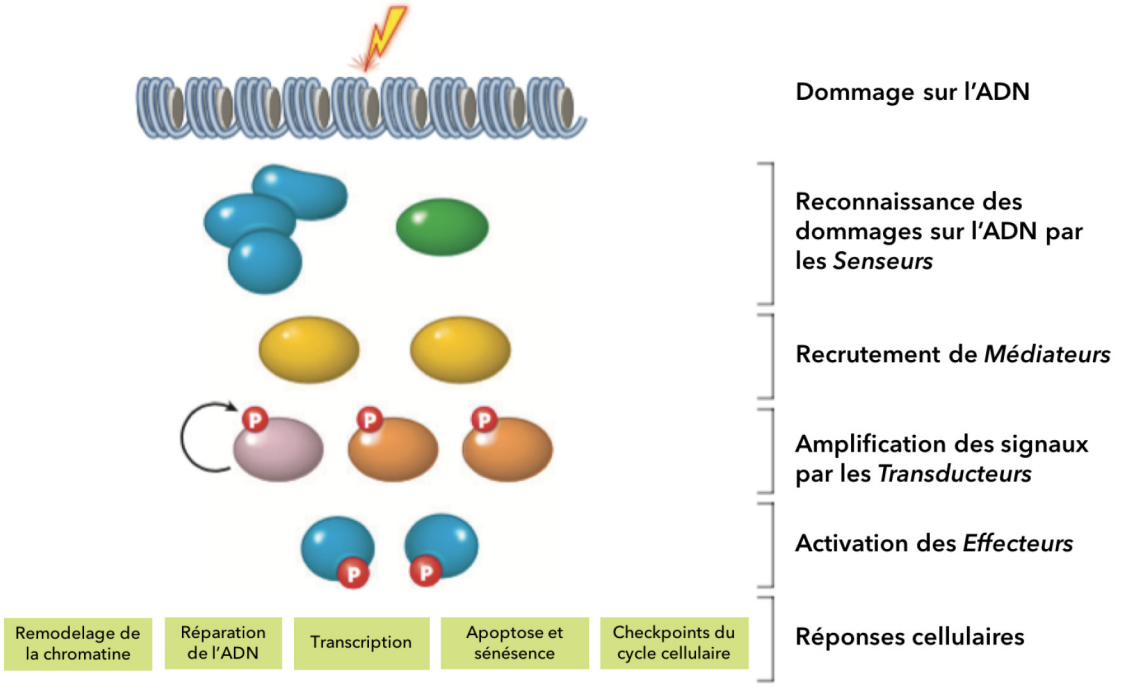


Figure 51 **Représentation schématique de la voie de réponse aux dommages à l'ADN**

Les dommages à l'ADN sont détectés par des facteurs protéiques senseurs qui déclenchent une transduction de signal mettant en jeu des médiateurs, des transducteurs et des effecteurs protéiques. La transduction du signal aboutit à un arrêt du cycle cellulaire, la réparation des dommages à l'ADN ou peut conduire à l'apoptose.
Figure adaptée de [281]

Les voies de réparation de l'ADN font intervenir un grand nombre de protéines cellulaires. Les dommages à l'ADN sont tout d'abord détectés par des senseurs, l'information est ensuite transmise à des médiateurs, des transducteurs et enfin des effecteurs par le biais de cascades d'activation de kinases. Les effecteurs entrainent des réponses cellulaires variées allant de la réparation de la lésion à l'apoptose de la cellule lorsque les dommages sont trop importants. (FIGURE 51)

Les principaux senseurs des lésions doubles brins dans le cas de la c-NHEJ sont Ku70/Ku80, PARP1 lors de l'activation d'Alt-EJ, ou le complexe MRN composé de la nucléase Mre11, de Rad50 avec une activité ATPase et de Nbs1 (*Nijmegen breakage syndrome 1*) pour les lésions traitées via HR. Ces senseurs permettent le recrutement de transducteurs que sont DNAPK (*DNA-activated protein kinase*), ATM *(Ataxia telangiectasia mutated protein*) ou ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3 related*). (FIGURE 49)

Lors de DSB traitées par HR, les cassures sont reconnues par le complexe MRN qui permet la phosphorylation d'ATM. ATM phosphorylée active des effecteurs de par, par exemple, la phosphorylation spécifique de sérines de l'histone H2AX (variant de l'histone H2A) au niveau des sites de dommages de l'ADN (γH2AX). γH2AX permet l'accumulation au niveau du dommage des enzymes de réparation dont le complexe MRN ou ATM. Au final γH2AX permet l'activation de CHK2 qui phosphoryle et stabilise p53, et qui prévient le blocage des cellules en phase S dans le contexte HR [282] (FIGURE 49).

VIII.2.1.a. Les dommages à l'ADN induits par radiations ionisantes

Les radiations ionisantes (RI) utilisées pour la radiothérapie provoquent au sein de la molécule d'ADN un nombre très élevé de lésions d'une grande variété et font des RI un agent physique cytotoxique largement utilisé en cancérologie. En effet, une dose de 1 Gy d'irradiation par rayons X ou γ provoque environ 40 DSB, soit cinq fois le nombre des mêmes lésions induites par les espèces réactives de l'oxygène du métabolisme par cellule et par jour. (TABLEAU 7)

Tableau 7 **Dommages sur l'ADN induits spontanément dans la cellules ou radio-induits**

Type de dommages	Taux de dommages induits spontanément/cellule/jour	Fréquence de dommages induits par les radiations ionisantes/cellule pour 1Gy
Cassures simple brin	55000	1000
Perte de bases puriques	12000	
Perte de bases pyrimidiques	600	
Dommages de bases		2000
Déamination de cytosine	200	
Oxydation de base	>1000	
Méthylation de la guanine	3000	
Cassures double brin	8	**40**
Pontages ADN-ADN	8	30
Pontages ADN-Protéines	Quelques-uns	150

VIII.2.1.b. Le stress réplicatif

Le stress réplicatif peut être défini comme toutes modifications anormales des paramètres de réplication. Au cours de la progression de la réplication, l'incorporation de nucléotides et la progression des ADN polymérases peuvent être gênées par une multitude d'obstacles engendrant un stress réplicatif. Ils peuvent être endogènes tels qu'un ralentissement de la vitesse de réplication, une modification du profil d'activation des origines de réplication, des régions difficiles à répliquer ; ou exogènes, dus à des agents inducteurs de dommages tels que les inhibiteurs de topoisomérases, les ribonucléotides réductases (dont l'hydroxyurée (HU)) ou l'exposition aux RI. De manière générale, les perturbations de la réplication peuvent entrainer des arrêts ou des effondrements de la fourche pris en charge différemment par la cellule.

Différents types de lésions et structures de l'ADN peuvent bloquer la fourche de réplication. Afin de stabiliser cette dernière, la kinase ATR doit reconnaitre le signal et activer la cascade en aval. Une de ces structures est l'ADN simple brin, il peut être formé suite au découplage hélicase/polymérase, être la conséquence d'une carence dans le pool de dNTP, ou encore apparaître suite à de la résection au niveau des SSB. La protéine RPA (*replication protein A*) reconnaît et interagit avec cet ADN simple brin, ce qui permet l'activation d'ATR. ATR à son tour peut activer des cascades de signalisation conduisant soit au redémarrage de la fourche de réplication via l'induction et la régulation du cycle cellulaire à travers CHK1, soit, lorsque la fourche de réplication ne peut pas redémarrer à la réparation de la lésion formée via la phosphorylation de RPA qui permet le recrutement des enzymes de la voie HR [283] [284].

VIII.2.2. PARP

VIII.2.2.a. La poly(ADP-riboses) polymérase PARP1 et la réparation des lésions de l'ADN

La PARylation

La PARylation est une modification post-traductionnelle réversible qui repose sur l'addition de molécules d'ADP-ribose (ADPr) sur des protéines acceptrices pour former des polymères nommés PAR. Cette PARylation est catalysée par des protéines de la famille des PARP (poly(ADP-riboses) polymérase) et est impliquée dans de nombreux processus cellulaires notamment la transcription et le remodelage de la chromatine mais aussi et surtout dans les mécanismes de réparation de l'ADN

Les protéines PARP utilisent le NAD+ (nicotinamide adénine dinucléotide) comme donneur d'unités d'ADP-ribose et génèrent un ADP-ribose et un nicotinamide par molécule de NAD+ métabolisée. Les PAR sont dégradés par l'activité enzymatique de la poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG).

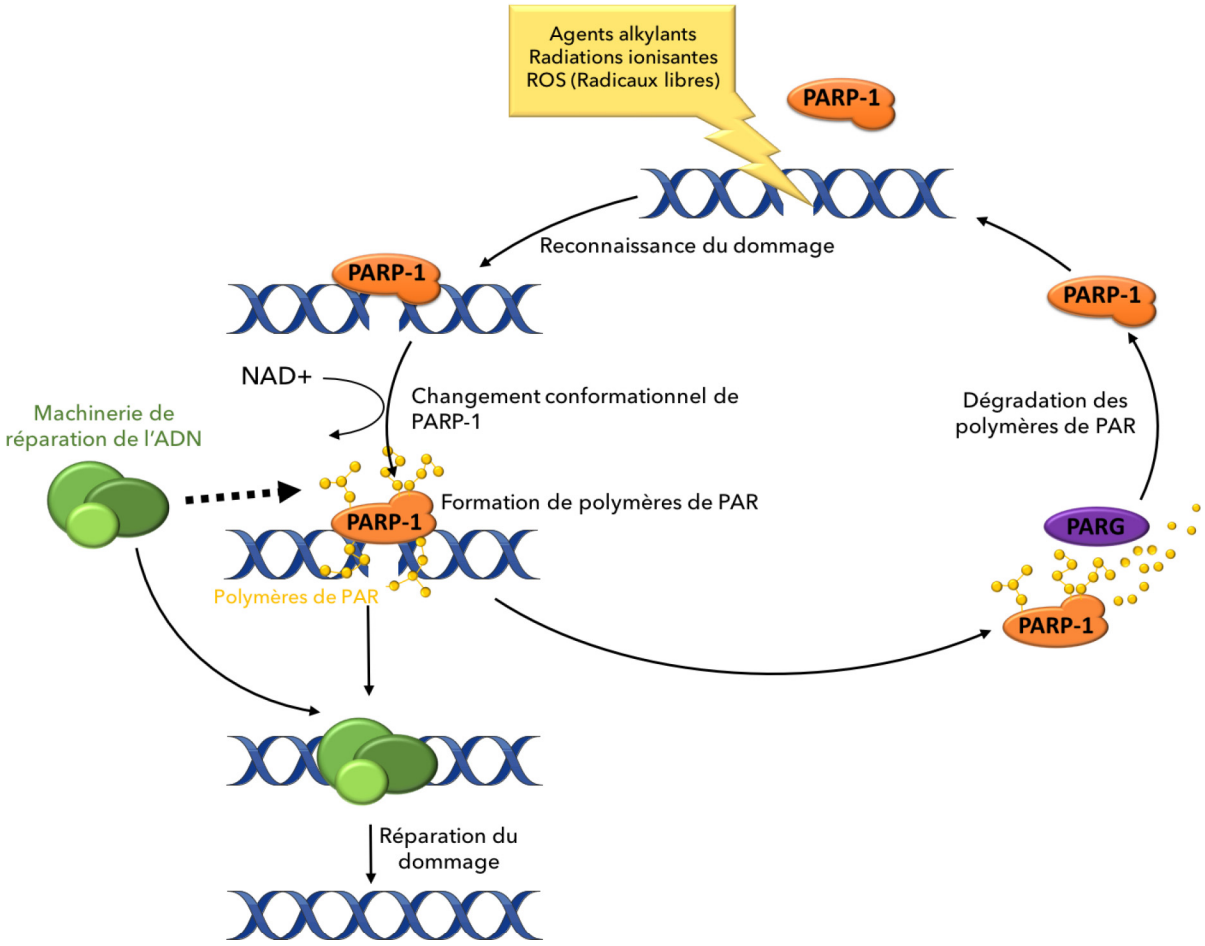


Figure 52 **PARP1 est impliquée dans la reconnaissance des lésions de l'ADN**

Les lésions de l'ADN sont reconnues par PARP1. La liaison de PARP1 avec l'ADN engendre un changement de conformation de PARP1 qui libère son site catalytique. PARP1 catalyse la formation de polymères de PAR à partir du NAD+. Les chaînes de PAR permettent le recrutement de la machinerie de réparation et la réparation du dommage. Les polymères sont rapidement dégradés par PARG et les protéines PARP1 sont recyclées.

PARP1 et réparation de l'ADN

PARP1 est le membre de la famille des PARP le plus abondant dans la cellule et elle est responsable de près de 85% de la PARylation totale. La PARylation joue un rôle important dans les mécanismes de réparation de l'ADN, en effet, le rôle de PARP1 et son activité de PARylation sont essentiels à la détection, la signalisation et la réparation des SSB et interviennent principalement dans les voies du BER et de l'Alt-EJ.

PARP-1 se lie rapidement à l'ADN, à travers son extrémité N-terminale et son motif en doigt de ZINC, elle est capable de détecter des SSB et procède à une auto-poly(ADP-ribosyl)ation permettant le recrutement de protéines via leurs domaines de liaison au poly(ADP-ribose) ainsi qu'une poly(ADP-ribosyl)ation de nombreuses protéines nucléaires. PARP-1, tout en modulant l'état de compaction local de la chromatine, permet le recrutement des facteurs de la machinerie de réparation aux sites de dommages à l'ADN. Cette signalisation effectuée par PARP-1 est rapide et transitoire, les polymères d'ADP-ribose sont rapidement dégradés par PARG. (**FIGURE 52**)

L'implication de PARP1 dans la réparation des dommages a l'ADN à dans un premier temps été décrite dans le BER [285] mais il participe également à la réparation de DSB [286]. En effet, PARP1 est un acteur central de la voie alternative du NHEJ, Alt-EJ [287] où elle facilite la détection des DSB et participe à l'amplification du signal conduisant à l'activation des transducteurs et effecteurs de la réponse aux dommages à l'ADN.

PARP1, ainsi que PARP2, interviennent également dans les mécanismes de recombinaison homologue [288] au niveau des fourches de réplication. PARP1 et PARP2 semblent impliquées dans le recrutement de MRE11 et l'initiation de la réparation. Par conséquent, PARP1 permet de faciliter le recrutement de nombreux facteurs nécessaires à une réparation efficace.

VIII.2.2.b. La réparation de l'ADN comme cible thérapeutique : les inhibiteurs de PARP

Les dérégulations des voies de réparation de l'ADN associées à une instabilité génomique engendraient une prédisposition au cancer, cependant, il est aussi possible de cibler ces dérégulations à des fins thérapeutiques.
En effet, altérer une voie de réparation dans des cellules cancéreuses qui possèdent déjà un dysfonctionnement dans une autre voie de réparation peut être létal pour celles- ci. De même, bloquer une voie de réparation tout en induisant des dommages à l'ADN par des agents chimio-thérapeutiques ou des radiations ionisantes permet de détruire les cellules cancéreuses. Sachant que PARP1 est au cœur de plusieurs voies de réparation de l'ADN, l'inhibition de cette protéine a montré des résultats prometteurs pour contrôler la croissance tumorale dans des modèles *in vivo* mais aussi en clinique.

Les inhibiteurs de PARP (PARPi) en cours de développement clinique miment la structure du NAD+ (substrat des PARP pour la synthèse de PAR) et lient l'enzyme au niveau de son site catalytique. L'inhibition de l'activité enzymatique des protéines PARP conduit à une absence de réparation des cassures simple brin. Ainsi, lors d'une cassure simple brin (SSB) au niveau d'une fourche de réplication, l'absence de PARP1 conduit à un arrêt et à un

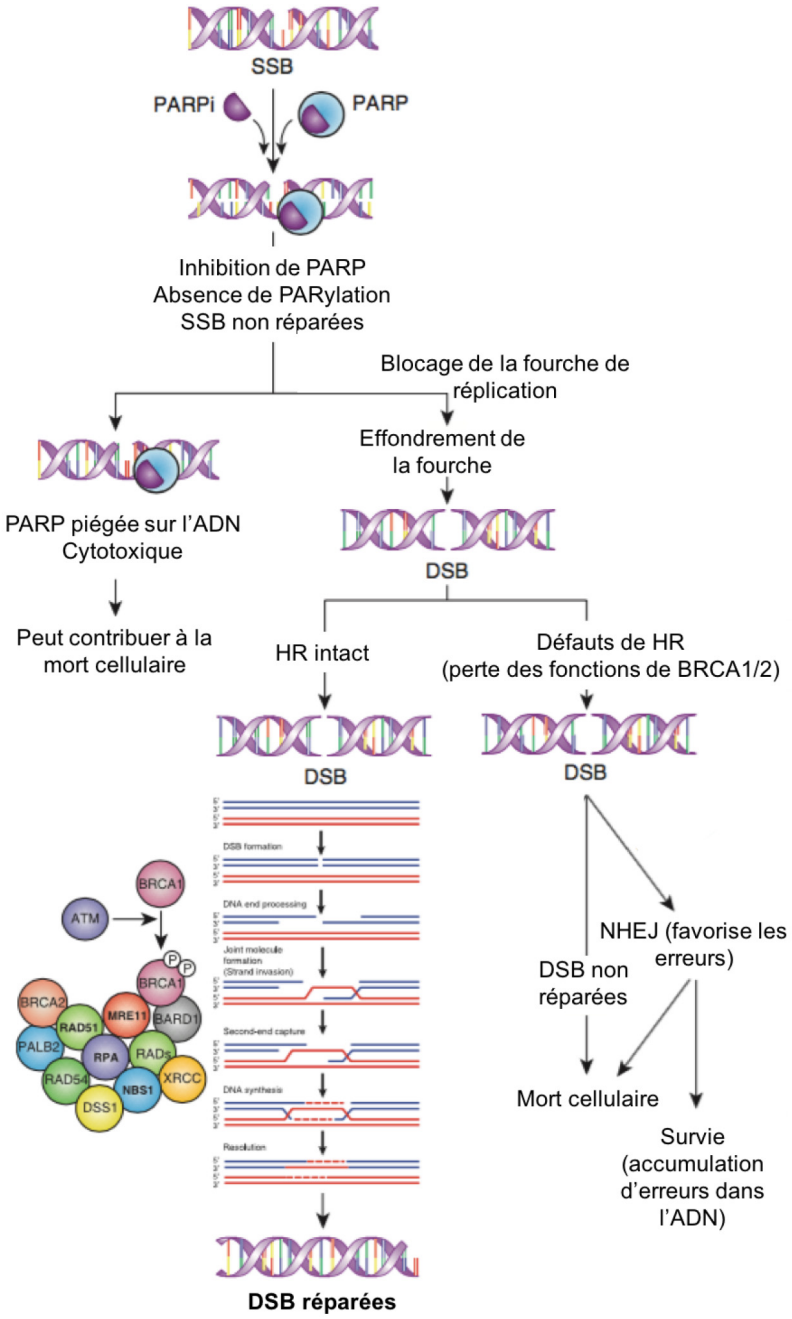


Figure 53 **Mécanismes de cytotoxicité induits par les inhibiteurs de PARP**

Deux mécanismes peuvent expliquer la cytotoxicité engendrée par les inhibiteurs de PARP. (À gauche) La liaison de PARPi avec PARP piège PARP sur l'ADN et forme un complexe ADN/PARP délétère pour la cellule. (À droite) L'absence d'activité catalytique de PARP empêche la réparation des SSB, bloque et provoque un effondrement de la fourche de réplication. Dans le cas de cellules dépourvues d'un mécanisme de HR fonctionnel, les DSB provoquées peuvent être réparées. En l'absence de HR, les DSB peuvent être traitées par NHEJ avec le risque de provoquer l'accumulation d'erreurs dans l'ADN. Les DSB non réparées vont engendrer la mort de cellules.
Figure adaptée de [289]

effondrement de la fourche et une conversion de la SSB en cassure double brin (DSB), on observe alors une accumulation de DSB qui doivent être réparées. Cependant, dans des cellules cancéreuses présentant de base des défauts dans les voies de réparation de l'ADN, comme l'absence de HR fonctionnelle, les cassures double brin ne sont pas réparées et conduisent à une mort des cellules. Dans le cas où la réparation des DSB se fait par NHEJ cela peut conduire à des erreurs dans la séquence ADN et ainsi conduire également à l'apoptose [289]. (FIGURE 53)

Un autre mécanisme peut contribuer aux effets de l'inhibition de PARP dans les cellules. Certains inhibiteurs de PARP (notamment le Veliparib, le Talazoparib, l'Olaparib ou le Niraparib) piègent les protéines PARP au niveau des sites d'ADN à réparer. En temps normal, l'autoPARylation de PARP par des polymères chargés négativement permet la dissociation de PARP de l'ADN. Les PARPi pourraient conduire à la formation d'un complexe PARP/ADN et ainsi inhiber le relargage de PARP du site d'ADN endommagé bloquant ainsi la réparation des SSB et conduisant à la génération d'une nouvelle lésion sur l'ADN, une liaison ADN/protéine. Ceci n'exclut pas la possibilité d'une conversion des SSB en DSB au niveau des fourches de réplication [290]. Les différents inhibiteurs de PARP actuels n'ont pas les mêmes capacités de fixation de PARP sur l'ADN, indépendamment de leur action sur l'activité catalytique [291], ceci pourrait donc jouer sur le choix des inhibiteurs à utiliser en clinique. (FIGURE 53)

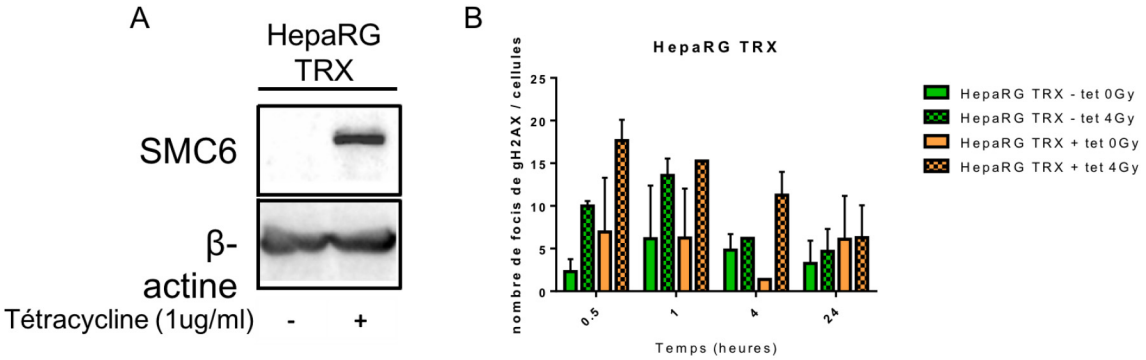


Figure 54 **Impact de l'expression de HBx sur la réparation des foyers de γH2AX après exposition aux radiations ionisantes**.

*A- **La déplétion de SMC6 est efficace dans les HepaRG TRX et avec l'utilisation du shSMC6***
Les culots cellulaires sont lysés dans un tampon de SDS 2% puis soniqués. Les protéines sont séparées par électrophorèse sur un gel d'acrylamide 8%. Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose par transfert liquide. Les protéines d'intérêts sont détectées par western blot avec des anticorps spécifiques. L'expression de HBx dans les HepaRG TRX est induite par l'ajout de la tétracycline (1ug/ml) dans le milieu de culture pendant 5 jours.

*B et C- **Altération de la réparation des foyers de γH2AX dans les cellules exprimant HBx.** Les radiations ionisantes (4Gy) induisent des cassures doubles brins dans l'ADN. Ces cassures et leurs réparations sont suivies par l'immunofluorescence des foyers de γH2AX. La réparation des DSB conduit à une diminution du nombre de foyers de γH2AX dans les noyaux des cellules au cours du temps. Les résultats présentés (B) correspondent à la moyenne de 2 expériences. Les moyennes présentées reflètent l'analyse de 400 à 1000 noyaux par conditions.*

VIII.3. Résultats

Les résultats ci-dessous ne sont pas encore publiés mais le manuscrit est en cours de préparation au moment de la rédaction de cette thèse. Je serai un des premiers auteurs de ce papier. Les auteurs ayant contribués aux résultats présentés ci-dessous sont :
Laetitia Gérossier* / Nadim Fares*, Alexia Paturel, Anaëlle Dubois, Loïc Peyrot, Magalie Jacquet, Pierre Saintigny, David Cox, Isabelle Chemin et Janet Hall
(* auteurs ayant contribués de manière équivalente au travail)

VIII.3.1. L'absence de SMC6 altère la réparation des cellules à la suite de dommages à l'ADN causés par les radiations ionisantes

Pour explorer l'impact de la perte de SMC6 sur les voies de réparation de l'ADN, la capacité de réparation des cellules face à ces lésions est analysée via la détection des foyers de γH2AX (phosphorylation de l'histone H2AX) à la suite de l'exposition des cellules à des radiations ionisantes. Ces foci sont des marqueurs de cassures doubles brins de l'ADN.

Les cellules HepaRG (lignée de progéniteurs hépatocytaires bipotents) ont été utilisées dans cette étude. Pour étudier l'impact de HBx, nous disposons au laboratoire d'une lignée HepaRG TRX, qui contient le gène HBx sous le contrôle d'un promoteur inductible à la tétracycline. (**Tableau 8**) La déplétion de SMC6 dans cette lignée à la suite de l'induction de l'expression de HBx est vérifiée par western blot (**Figure 54 A**).
Cependant comme, nous l'avons vu dans l'introduction bibliographique de ce manuscrit, le rôle de la protéine HBx ne serait pas limité à son interaction avec DDB1 et le complexe SMC5/6. Pour s'affranchir des autres interactions possibles de HBx dans la cellule, nous avons envisagé d'utiliser un modèle de cellules HepaRG transduites de façon transitoire par le biais de lentivirus et exprimant un shARN contre l'ARN de SMC6. Les lentivirus sont disponibles au laboratoire et les expériences sont en cours.

L'exposition aux rayons ionisants induit la formation de foyers de γH2AX. Ces foci sont suivis par immunofluorescence grâce à des anticorps spécifiques, les cellules sont fixées à différents temps post-irradiation de façon à analyser la réparation des lésions au cours du temps (**Figure 54 B**). La réparation des lésions doubles brins dans les cellules de mammifères est généralement biphasique : une réduction rapide de nombre de foci par cellules 4 heures après l'irradiation, qui correspond à la réparation des lésions dans les régions avec une chromatine peu condensée et donc facile d'accès pour les complexes de réparation ; suivi par une réparation plus lente des régions de la chromatine où la compaction est plus importante [292].

Dans les cellules HepaRG TRX (**Figure 54 B**), le nombre de foci maximal par cellule est obtenu très rapidement après l'irradiation. Pour les cellules exprimant HBx celui-ci a lieu 30 minutes après RI alors qu'il n'a lieu qu'au bout d'1 heure dans les cellules contrôles. Ce décalage dans la cinétique pourrait être le signe d'une structure différente de la chromatine entre les deux conditions. En effet, la détection et la réparation des DSB dans une chromatine plus condensée sont plus difficiles, en raison d'un accès limité pour les facteurs de réparation.

Tableau 8 **Liste des différentes lignées cellulaires utilisées dans cette étude et leurs caractéristiques.**

Lignée cellulaire	***Origine***	***Caractéristiques***
HepG2	Hépatoblastome	Lignée tumorale
HepG2.2.15	Dérivée de HepG2	Porte 4 copies en tandem du génome de HBV
HepG2 K6	Dérivée de HepG2	Porte 1,5 copie du génome de HBV, mutée pour l'expression de HBx
HepaRG	Tumeur du foie associé à HCV	Lignée de progéniteurs hépatocytaires bipotents, non tumorigéniques
HepaRG TRX	Dérivée de HepaRG	Porte le gène HBx sous le contrôle d'un promoteur inductible à la tétracycline
Hep3B	CHC	Porte le génome de HBV intégré mais n'exprime que le gène de HBs
PLC-PRF-5	CHC	Porte le génome de HBV intégré, exprime et sécrète de l'antigène HBs

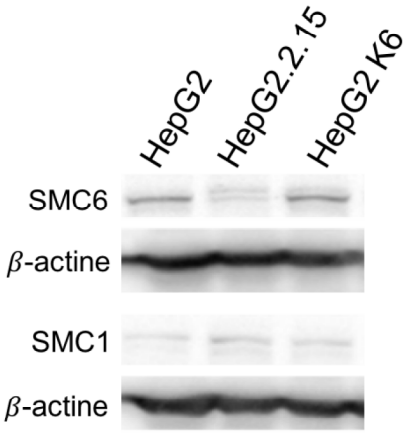


Figure 55 **Présence de la protéine SMC6 dans les lignées utilisées**

Les cellules HepG2.2.15 expriment moins de protéine SMC6.
La détection de SMC6 par western blot est calibrée sur la détection de la β-actine. La dégradation de SMC6 dans la lignée HepG2.2.15 est spécifique et n'altère pas la protéine SMC1.

En absence de détection, les voies de réparation ne sont pas activées et la phosphorylation de H2AX n'as pas lieu. De plus, il semblerait que la présence de HBx ralentisse la réparation des DSB. En effet, 4 heures post RI, les cellules contrôles retrouvent un taux basal de foci (6 foci/cellules) alors que les cellules exprimant HBx n'ont pas encore réparé tous leurs dommages.

Ces premiers résultats nous informent que l'absence de la protéine SMC6 dans les cellules HepaRG altère la réparation des dommages à l'ADN induits par des rayons ionisants.

VIII.3.2. Le stress réplicatif engendré par le traitement à l'hydroxyurée est délétère pour les cellules exprimant HBx

L'hydroxyurée (HU) est probablement l'un des inhibiteurs les plus utilisés en recherche pour induire un stress réplicatif dans la cellule. En effet, il permet de réduire le pool de dNTPs, provoquant un ralentissement, voire une inhibition de la synthèse d'ADN. Les effets du HU sont réversibles dès élimination de la drogue et ils dépendent des concentrations et des temps d'exposition. Ainsi, par exemple, dans les cellules de mammifères, une exposition de 2h au HU à 2mM va induire un ralentissement de la fourche sans formation de dommages de l'ADN alors qu'un traitement plus long (plus de 12h), à la même concentration, va induire des cassures double brin et un arrêt des fourches de réplication [293]. Cet inhibiteur s'est avéré efficace en clinique, dans le traitement de la drépanocytose [294] et en onco-hématologie.

Nous utilisons dans cette partie de notre étude les lignées HepG2, HepG2.2.15 et HepG2 K6 (**TABLEAU 8**). La lignée HepG2 est issue d'un hépatoblastome. Les cellules HepG2.2.15, dérivées des HepG2, portent le génome de HBV WT intégré, elles expriment donc toutes les protéines virales de HBV, notamment HBx. En revanche les HepG2 K6, portent le génome de HBV muté pour l'expression de HBx, elles expriment toutes les protéines virales à l'exception de HBx. Nous avons vérifié par western blot la déplétion de SMC6 dans les HepG2.2.15 exprimant HBx (**FIGURE 55**).

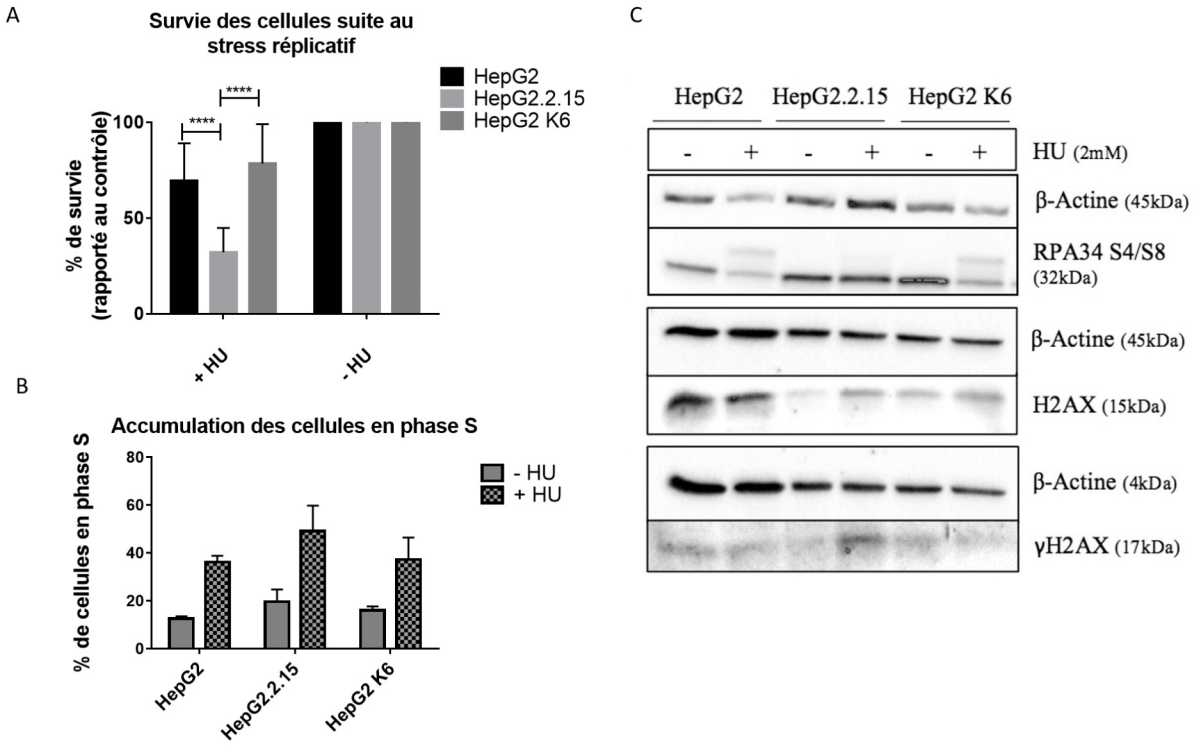


Figure 56 **Modulation des voies de réparation suite au stress réplicatif induit par l'hydroxyurée en présence de la protéine HBx**

*A. **Les cellules exprimant la protéine HBx sont plus sensibles aux effets de l'HU**. Un test de survie clonogénique permet d'étudier la cytotoxicité de l'HU sur différentes lignées toutes dérivées des cellules HepG2 ; les cellules HepG2.215 expriment toutes les protéines virales dont HBx, les cellules HepG2 K6, expriment également toutes les protéines virales à l'exception de la protéine HBx. Les cellules sont traitées avec l'HU pendant 24h, puis les cellules sont laissées en culture jusqu'à la formation de colonies de plus de 50 cellules visibles à l'œil nu. Les données représentent la moyenne +/- la déviation standard, issus de 3 expériences indépendantes faites en triplicats (test t sur données non appariées, **** p<0.0001)*

*B**. Une accumulation des cellules en phase S après traitement à l'HU est associée à la présence de la protéine HBx**. Représentation graphique du pourcentage des cellules en phase S basé sur l'accumulation d'iodure de propidium analysée par cytométrie en flux. Les cellules sont au préalable traitées pendant 24h à l'HU (2mM). Les données représentent la moyenne de deux expériences indépendantes. L'analyse en cytométrie est réalisée à chaque fois sur 10^4 évènements.*

*C**. Absence de phosphorylation de RPA et accumulation de DSB dans les cellules exprimant HBx et traitées par HU**. Les protéines H2AX, γH2AX et la phosphorylation de RPA sont analysés par western blot depuis des extraits protéiques (20ug) de cellules HepG2, HepG2.2.15 and HepG2 K6 après un traitement à l'HU (2mM) de 24H. L'image présentée est représentative de 3 expériences indépendantes.*

La toxicité due à l'exposition des cellules HepG2, HepG2.2.15 et HepG2 K6, à l'hydroxyurée (2 mM) pendant 24 heures est analysée via un test de survie clonogénique (FIGURE 56). On peut noter que les cellules exprimant le virus dans sa totalité, les HepG2.2.15, sont plus sensibles que les cellules dépourvues de la protéine HBx, HepG2 K6. En effet, après un contact de 24 heures avec l'HU, le taux de survie des cellules HepG2.2.15 est de 32% alors qu'il est de 78% pour les cellules HepG2 K6. La survie des cellules HepG2 est quasiment identique à celle des cellules HepG2 K6 **(FIGURE 56 A)**.

Le stress réplicatif engendré par l'HU provoque un blocage des fourches de réplication, une activation des checkpoints[7] cellulaires et un blocage des cellules en phase S. Un marquage de cellules à l'iodure de propidium et une analyse par cytométrie en flux nous ont permis d'analyser la phase du cycle cellulaire de nos cellules après le traitement à l'HU **(FIGURE 56 B)**. Nos résultats indiquent que le traitement à l'HU provoque une accumulation des cellules en phase S pour les trois lignées. Le pourcentage d'accumulation des cellules est le même pour toutes les lignées, en revanche, les cellules HepG2.2.15 semblent avoir de base plus de cellules en phase S que les autres lignées malgré un ensemencement des cellules dans les mêmes conditions expérimentales. Ces résultats suggèrent que les cellules exprimant HBx ont une croissance ralentie. **(FIGURE 56 C)** Nous avons testé cette hypothèse dans un modèle de HepaRG TRX induit à la tétracycline et nos premiers résultats semblent confirmer cette hypothèse (FIGURE 57). Cependant, on observe tout de même une accumulation des cellules en phase S, les cellules exprimant HBx sont donc capables d'activer les checkpoints et le blocage en phase S après HU. Néanmoins, le taux de survie plus bas pour les cellules HepG2.2.15 après HU suggère des défauts dans l'activation des voies de DDR. Pour répondre à cette hypothèse, nous avons ensuite analysé la quantité de la protéine RPA totale par western blot. On observe, en réponse au traitement à l'HU, un changement de taille de la protéine de RPA (band shift) signe d'une phosphorylation et d'une activation de la protéine. Néanmoins, l'activation de RPA n'est pas détectée dans les HepG2.2.15. Ce résultat suggère que dans ces cellules l'activation de RPA, nécessaire à la mise en place de la recombinaison homologue n'est pas efficace. Néanmoins, la détection de γH2AX, comme marqueur des DSB dans la cellule, nous informe que 24h après le traitement HU, il y a une accumulation de dommages persistants dans les cellules HepG2.2.15.
Ainsi, l'ensemble de ces résultats confirment que la présence de HBx dans les cellules affecte leurs réponses au stress réplicatif engendré par l'hydroxyurée en altérant la mise en place d'une recombinaison homologue efficace.

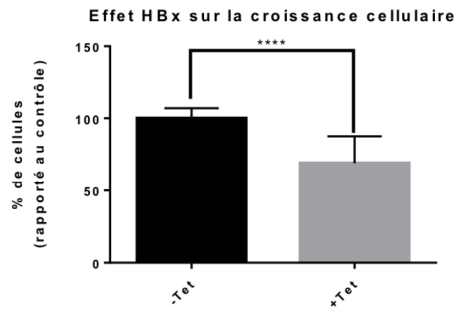


Figure 57 **L'expression de HBx dans les cellules HepaRG est ralentie la croissance cellulaire**

*Les cellules sont ensemencées à la densité de 8000 cellules/cm^2, le lendemain une partie des cellules est traitées à la tétracycline (1ug/ml) pendant 5 jours. Le nombre de cellules dans les flasks est ensuite déterminé par comptage au bleu Trypan. Les données présentées sont exprimées en pourcentage par rapport aux cellules contrôles et sont représentatives de 12 expériences indépendantes. (test t sur données non appariées, **** p>0.0001)*

[7] Checkpoint : Moment du cycle cellulaire où la séquence et la structure de l'ADN sont vérifiées par les protéines cellulaires avant de permettre la progression des cellules dans le cycle cellulaire.

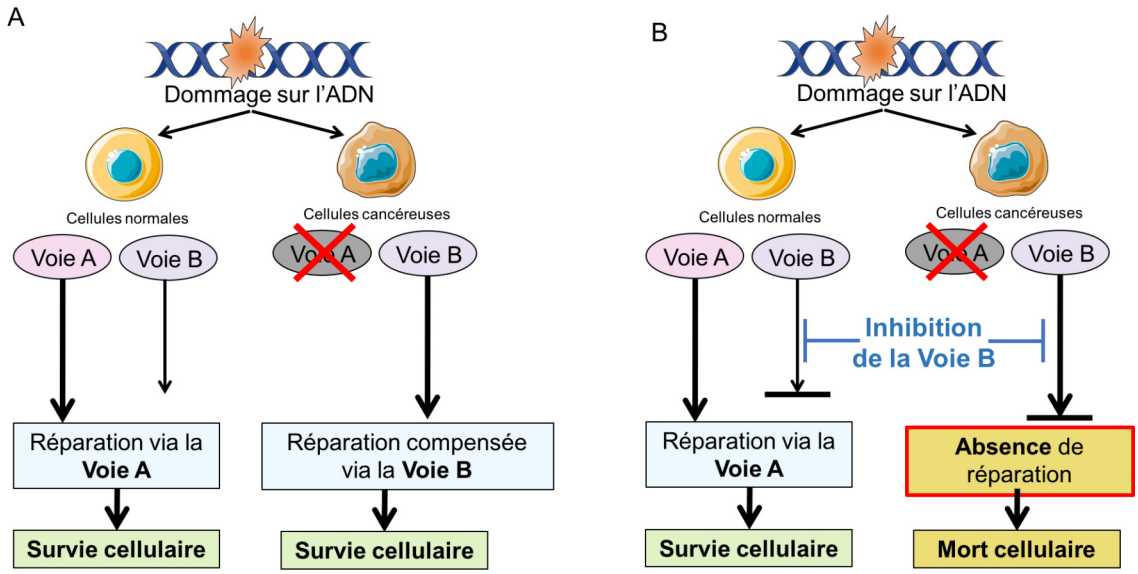


Figure 58 **Le principe de la létalité synthétique adapté au traitement des cellules cancéreuses.**

A. Dans une cellule normale, plusieurs voies peuvent participer à la réparation des dommages sur l'ADN. Dans une cellule cancéreuse, si l'une des voies est inhibée ou dérégulée, la seconde voie peut compenser l'absence de la première et promouvoir la survie de la cellule.
B. L'utilisation d'inhibiteurs, permet de bloquer la seconde voie de réparation pour empêcher la réparation de la cellule et induire la mort de la cellule cancéreuse. Dans cette condition la cellule normale n'est pas affectée car sa réparation passe par la voie A.

VIII.3.3. L'utilisation des inhibiteurs de PARP et le principe de la létalité synthétique

L'utilisation des PARPi peut être envisagée en thérapie dans une stratégie de létalité synthétique. La létalité synthétique est définie par la situation dans laquelle deux mutations/altérations dans un ou plusieurs gènes n'ont individuellement aucun effet mais la combinaison des deux mutations est létale. D'un point de vue thérapeutique ceci consiste à cibler un gène spécifique dans un contexte ou un autre gène est dérégulé. Ainsi, le traitement est spécifique des cellules portant déjà une mutation et il permet de limiter les effets secondaires dans les cellules saines. (FIGURE 58)

Par exemple, dans les cancers du sein et de l'ovaire associés aux mutations héréditaires dans les gènes *BRCA1* et *BRCA2*. Les patientes sont hétérozygotes pour la mutation, ainsi les cellules saines conservent une copie sauvage du gène. Cependant dans les tumeurs, où l'allèle sauvage est souvent délété, les cellules sont donc déficientes en BRCA. Ainsi, l'utilisation des PARPi conduit à un effet synthétique létal spécifiquement pour les cellules cancéreuses. [295, 296](FIGURE 59)

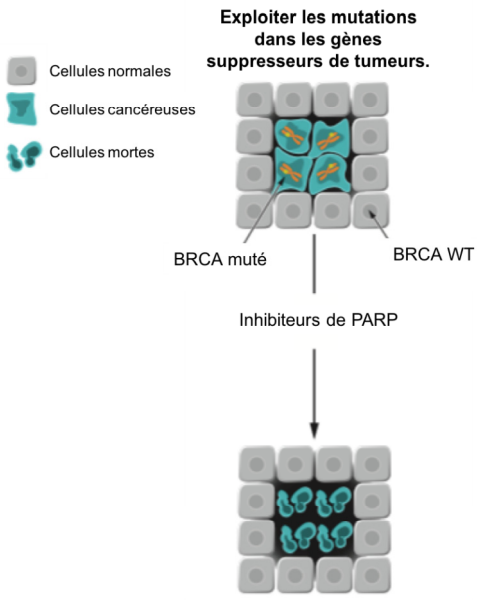


Figure 59 **L'utilisation des inhibiteurs de PARP dans le cas de cellules mutées sur le gène BRCA**

Les mutations (points jaunes sur les chromosomes orange) peuvent rendre les cellules cancéreuses plus susceptibles aux dommages à l'ADN et aux inhibiteurs de DDR dont PARP, le principe de la létalité synthétique conduit à la mort sélective des cellules portant la mutation BRCA.
Figure adaptée de [297]

Les PARPi apportent aux cellules une hypersensibilité aux radiations ionisantes et aux agents alkylants, ainsi l'hypothèse de combiner leur utilisation avec des agents endommageant l'ADN est apparue avec notamment l'utilisation de molécules de chimiothérapies classiques et la radiothérapie. Les radiations ionisantes induisent une grande quantité de dommages sur l'ADN et notamment un grand nombre de DSB. L'accumulation de ses lésions engendre la létalité des cellules. L'association avec les PARPi induit une augmentation de cette accumulation via la conversion des SSB en DSB dans les cellules en cours de réplication. Ainsi

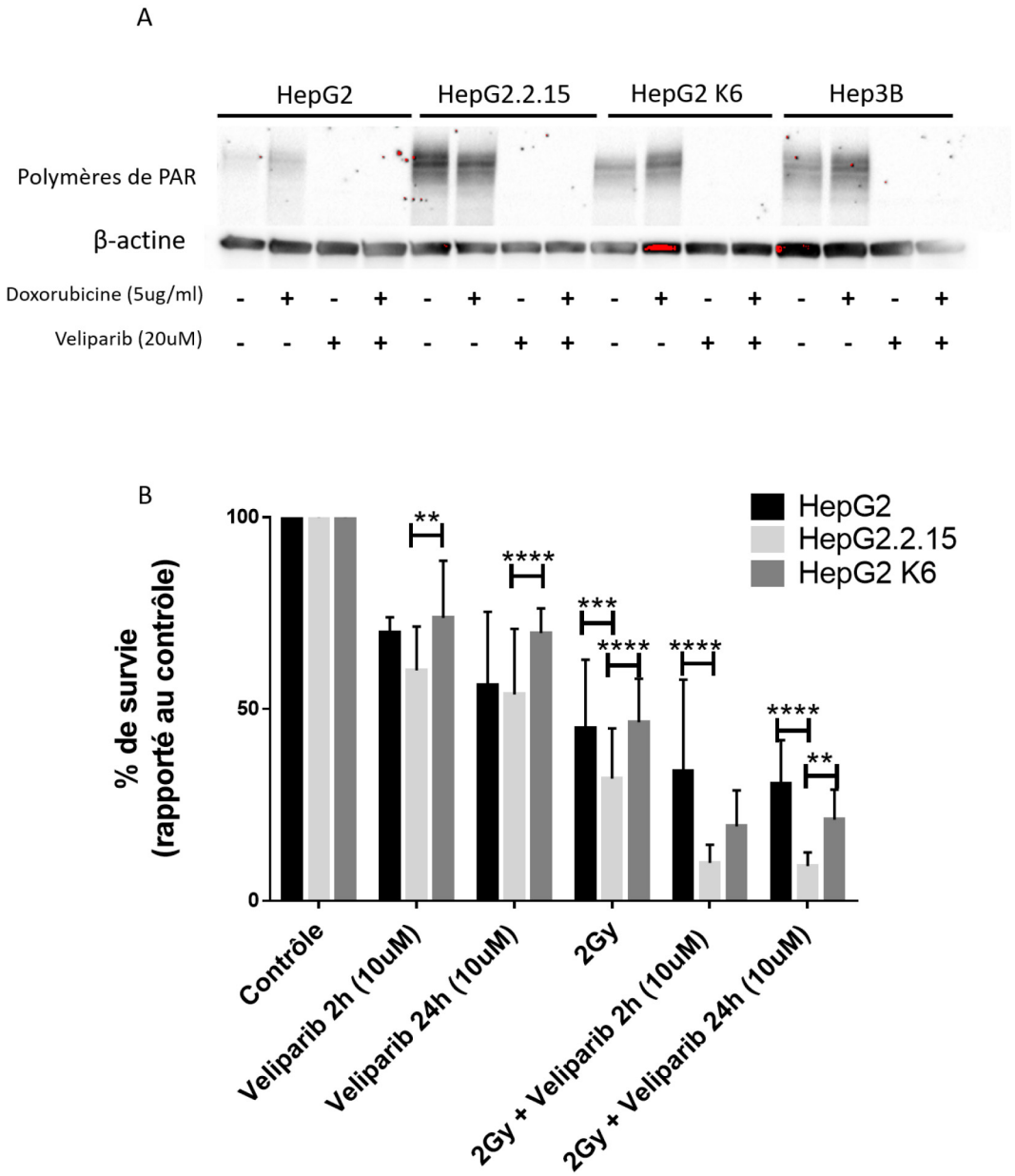


Figure 60 **Les inhibiteurs de PARP sensibilisent les cellules aux rayons ionisants : un effet plus important lors de l'expression de HBx**

*A- **L'inhibiteur de PARP, Veliparib, inhibe l'activité de PARylation, dans les cellules.** La détection par western blot des polymères de PAR permet de détecter l'efficacité de l'inhibiteur. Les cellules sont traitées à la doxorubicine 5ug/ml pendant 30 minutes en présence ou non de l'inhibiteur de PARP (1h). La doxorubicine induit la formation de polymères de PAR. Les conditions doxorubicine + Veliparib montre l'efficacité de l'inhibiteur.*

*B- **L'expression de HBx sensibilise les cellules à la combinaison entre les rayons ionisants et le Veliparib.** Le pourcentage de survie des cellules est analysé par des tests de survie clonogénique. Les cellules sont traitées avec le Veliparib (10uM) pendant 24h, ou exposées aux RI (2Gy). Pour la combinaison des deux traitements les cellules sont mise en contact avec l'inhibiteur 1 heure avant l'exposition aux RI. Les données sont rapportées à la viabilité des cellules dans la condition contrôle, elles représentent la moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes réalisées en triplicats. Les barres d'erreurs représentent la moyenne d'au moins 2 expériences en triplicats ± SD (écart type)*
Les analyses statistiques ont été réalisées par des tests t avec des données non appariées.
(p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,005 ; **** p<0,001 ; ns = non significatif)*

les PARPi permettraient de limiter la capacité d'échappement des tumeurs à la chimiothérapie et radiothérapie, en les empêchant de réparer leurs dommages pour induire leur mort.

Aucun résultat d'étude clinique sur les PARPi en combinaison avec une radiothérapie n'a été publié à ce jour notamment concernant le carcinome hépatocellulaire. Cependant les études antérieures menées dans notre équipe par Clément Guillot, ont montré une efficacité additive à la combinaison des traitements de 2 heures par l'inhibiteurs de PARP, le Veliparib, et des radiations ionisantes sur une sélection de lignées d'hépatocarcinomes humains [230], apportant une preuve de concept.

Dans notre étude, nous avons utilisé les lignées de HepG2.2.15 et HepG2 K6 pour étudier l'impact de HBx sur les cellules suite à l'exposition à des rayons ionisants (2Gy), à l'inhibiteur de PARP (Veliparib 10uM) ou à la combinaison des deux traitements. Pour vérifier l'efficacité de l'inhibition de l'activité PARP suite à l'utilisation du Veliparib, nous avons réalisé un western blot sur les polymères de PAR. L'efficacité de l'inhibiteur est confirmée car le Veliparib est capable d'inhiber la formation de polymères en réponse aux dommages générés par un traitement à la doxorubicine. (**FIGURE 60 A**)
Une étude de survie clonogénique nous permet de noter le pourcentage de survie des cellules suite aux différents traitements. (**FIGURE 60 B**) Les trois lignées sont sensibles à l'utilisation de l'inhibiteur de PARP pendant 2h ou 24h. On remarque néanmoins une efficacité plus importante pour les cellules exprimant HBx. Les rayons ionisants sont plus efficaces que le traitement au Veliparib seul, et encore une fois les cellules HepG2.2.15 semblent plus sensibles. Enfin lorsque l'on combine l'inhibition de PARP et l'irradiation (les cellules sont mises en contact avec l'inhibiteur 1 heure avant RI pour 24 heures), le taux de survie des cellules est bien plus faible, de l'ordre de 20% pour les HepG2 et 5% pour les HepG2.2.15.

La présence de la protéine HBx sensibilise les cellules aux dommages engendrés par l'exposition aux rayons ionisants, cette sensibilité est augmentée par l'utilisation de l'inhibiteur de PARP, le Veliparib.

Les études antérieures menées dans l'équipe laissaient supposer que certaines lignées de carcinomes hépatocellulaires étaient plus résistantes au traitement par l 'inhibiteur de PARP, Veliparib, c'est le cas notamment pour les cellules Hep3B et PLC-PRF-5. Il existe différents inhibiteurs de PARP connus pour leurs capacités différentes de fixation de PARP sur l'ADN [291]. Les inhibiteurs tels que le Talazoparib pourraient augmenter l'efficacité du traitement en favorisant la formation de complexe PARP/ADN cytotoxique. Pour confirmer ces hypothèses nous avons comparé sur les lignées PLC-PRF-5 et Hep3B l'activité cytotoxique du Veliparib et du Talazoparib. (**FIGURE 61**)

Les cellules PLC-PRF-5 sont sensibles au Veliparib seul ou à l'irradiation seule, cependant la combinaison entre le Veliparib et les radiations ionisantes n'est pas additive. En revanche on observe une nette additivité des effets de RI et du Talazoparib.
Les cellules Hep3B, sont décrites dans la littérature pour leur forte capacité de réparation par recombinaison homologue ou NHEJ. Ces cellules, de la même manière que les PLC-PRF-5, ne montrent pas d'effet additifs lors de l'utilisation de RI et du Veliparib à une dose de 10uM, cependant, en augmentant la dose de Veliparib de 10 fois, le taux de survie des Hep3B diminue. Néanmoins, un pourcentage non négligeable (25%) de cellules résiste à cette combinaison.

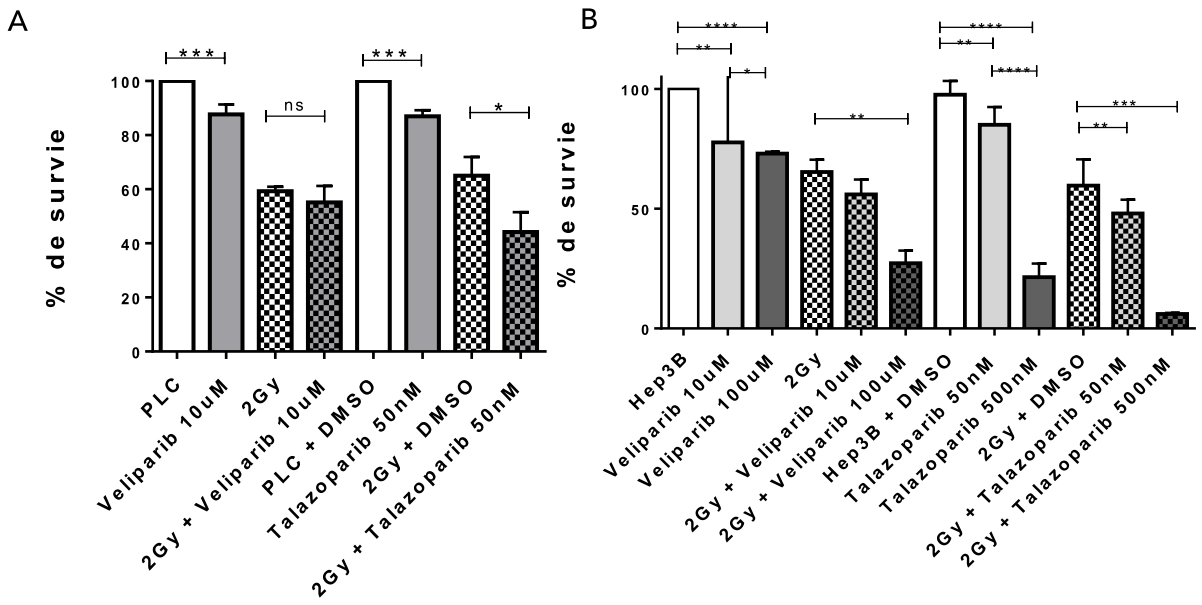


Figure 61 **Comparaison de l'efficacité de deux inhibiteurs de PARP, le Veliparib et le Talazoparib**

Le pourcentage de viabilité de cellules PLC-PRF-5 (A) et Hep3B (B) est analysé en réponse aux traitements aux inhibiteurs de PARP pendant 24h. Les doses utilisées, Veliparib 10uM et Talazoparib 50nM, sont les doses minimales permettant une inhibition complète de l'activité de PARP suite à un traitement à la doxorubicine (données non montrées). Les cellules sont également exposées à des rayons ionisants (2Gy) seuls ou en combinaison avec les inhibiteurs de PARP. Les données sont rapportées au pourcentage de viabilité dans les conditions contrôles (barres blanches)

La condition avec ajout de DMSO sert de contrôle au traitement avec le Talazoparib, dissout dans le DMSO. Dans le cas des cellules Hep3B, une dose 10 fois supérieure des inhibiteurs de PARP permet d'augmenter l'efficacité de réponse.

Les barres d'erreurs représentent la moyenne d'au moins 2 expériences en triplicats ± SD (écart type)

Les analyses statistiques ont été réalisées par des tests t avec des données non appariées.

(p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,005 ; **** p<0,001 ; ns = non significatif)*

L'utilisation du Talazoparib à une dose de 500nM en combinaison avec RI, permet quant à elle l'élimination quasi totale des cellules. Ainsi nos données confirment une efficacité différente des inhibiteurs de PARP.

Nos résultats montrent que la dégradation de SMC5/6 dans les cellules hépatocytaires pourrait être exploitée à des fins thérapeutiques. Les défauts dans la DDR engendrée par la perte de SMC5/6 pourraient être augmentés par l'utilisation de molécules inhibitrices de DDR, notamment les inhibiteurs de PARP, et ainsi sensibiliser les cellules cancéreuses aux radiations ionisantes de la radiothérapie.

VIII.3.4. Radiations ionisantes et inhibiteurs de PARP une combinaison au profit du traitement des CHC ?

Les travaux publiés précédemment au sein de l'équipe ont montré que (i) la radiothérapie s'avère une option en partie efficace pour traiter les CHC [190], malgré un pourcentage de tumeurs résistantes aux RI (ii) que *in vitro* les lignées cancéreuses d'hépatocytes étaient sensibles aux radiations ionisantes et (iii) que l'utilisation d'inhibiteurs de la DDR en combinaison avec les RI permettait de diminuer la survie des cellules [230]. Ces résultats ont été confirmés par notre étude (**FIGURE 60 B**).

La résistance des tumeurs face aux RI peut s'expliquer par la dérégulation des voies de réparation de l'ADN. C'est pourquoi nous avons initié une étude globale visant à analyser la dérégulation au niveau protéique des voies de réparations dans des cohortes de tumeurs de CHC.

Dans un premier temps, nous avons eu accès à la base de données TCGA (The Cancer Genoma Atlas[8]) via le site de CBioPortal [298, 299] afin d'étudier l'expression des messagers de 213 gènes impliqués dans les voies de réparation de l'ADN (liste de gènes tirée de [279]) dans les tumeurs CHC. Il en est ressorti une dérégulation importante de 9 gènes impliqués dans diverses voies de réparation. De façon intéressante, le gène de PARP1 est surexprimé dans près de 30% des CHC étudiés toutes étiologies confondues. (**FIGURE 62**) La limite de cette approche repose sur l'absence de normalisation car nous n'avons pas accès via le site de CBioPortal aux données des échantillons contrôles.

[8] La cohorte TCGA correspond à une base de données internationale regroupant des échantillons de nombreux types de cancers.

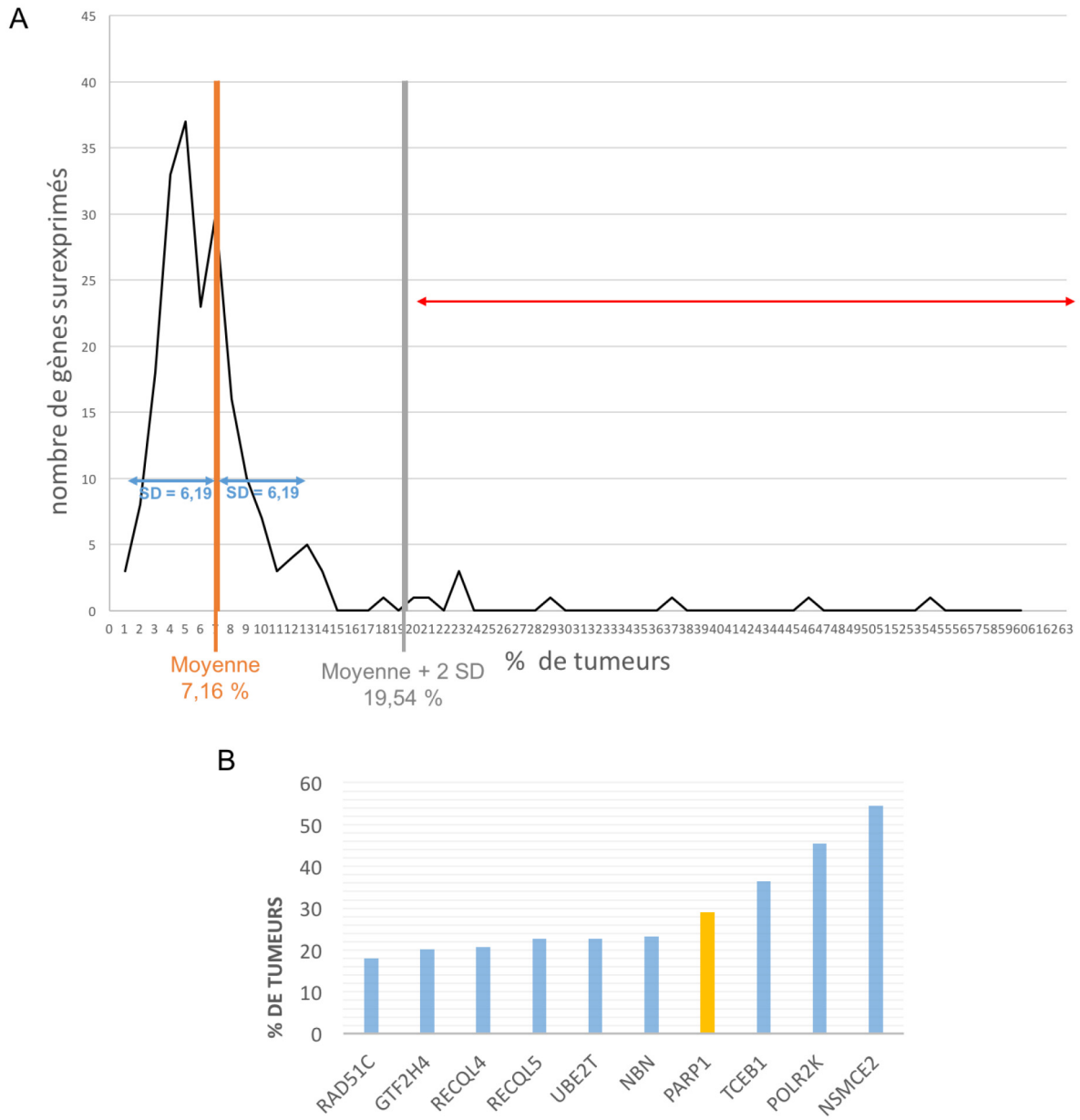


Figure 62 **PARP1 fait parti des 9 gènes les plus surexprimés dans les CHC toutes étiologies confondues**

A- Répartition du nombre de gènes surexprimés dans les tumeurs de CHC d'étiologies HBV, HCV et Alcool. Les résultats sont exprimés en fonction du pourcentage de tumeurs présentant la surexpression. Les z-scores issus de CBioPortal représentent l'expression des ARNm (RNASeq V2 RSEM). Un gène est considéré comme surexprimé lorsque le z-score est supérieur à 2. Pour chaque gène le pourcentage de tumeur présentant une surexpression du gène en fonction du nombre total de tumeurs étudiés (189 tumeurs) est calculé. Pour définir les 9 gènes les plus surexprimé, le cut-off est défini par rapport à la moyenne des données + 2 fois la déviation standard (SD).

B- Répartition des 9 gènes les plus souvent surexprimés en fonction du pourcentage de CHC.

Dans un second temps avec l'aide de P. Saintigny (CRCL, Lyon) nous avons eu accès aux données plus complètes de la cohorte TCGA. Nous avons pu extraire de la banque de données 50 couples de tumeurs/non tumeurs de CHC avec une étiologie définie. L'expression des messagers de PARP1, PARP2, PARP3 et PARG ont été analysés. (FIGURE 63) La comparaison entre les tumeurs et les non tumeurs nous permet de noter que PARP1, PARP2 et PARG sont surexprimés dans les CHC toutes étiologies confondues. La même tendance est observée pour PARP3 mais le résultat n'est pas statistiquement significatif. Nous avons initié les analyses en fonction de l'étiologie mais le nombre d'échantillons étant faibles (de l'ordre de 5 à 19 échantillons par étiologie) les résultats ne sont pas robustes et ne permettent pas de voir une variation entre les étiologies.

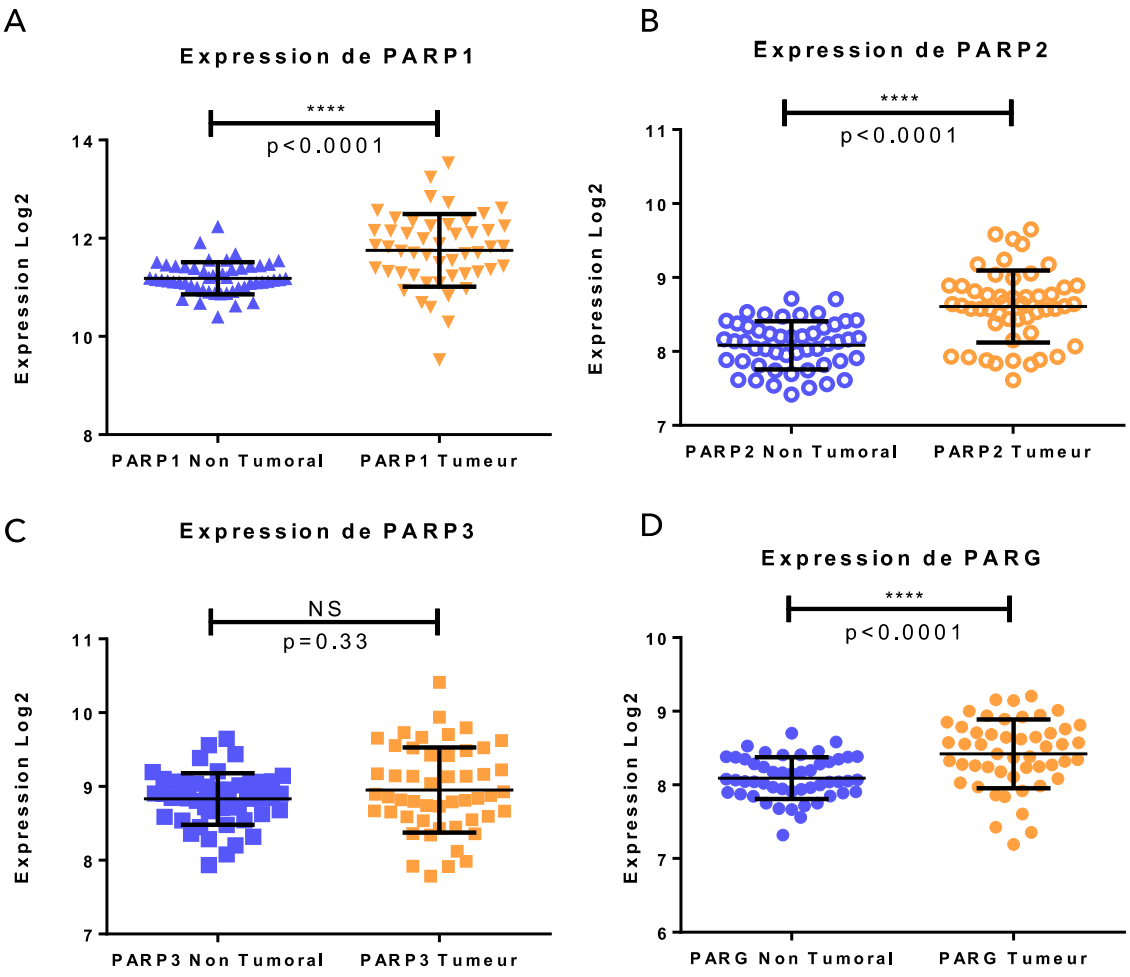


Figure 63 **Niveau d'expression de PARP1, PARP2, PARP3 et PARG dans les CHC toutes étiologies confondues dans les tissus tumoraux et non-tumoraux.**

*Les données d'expression d'ARNm ont été obtenues depuis la cohorte TCGA via la base de données CBioPortal [298, 299]. Les données normalisées générées par RNA-sequencing sont exprimées en log2. La significativité statistique est estimée par des tests de Wilcoxon (****p<0,001)*

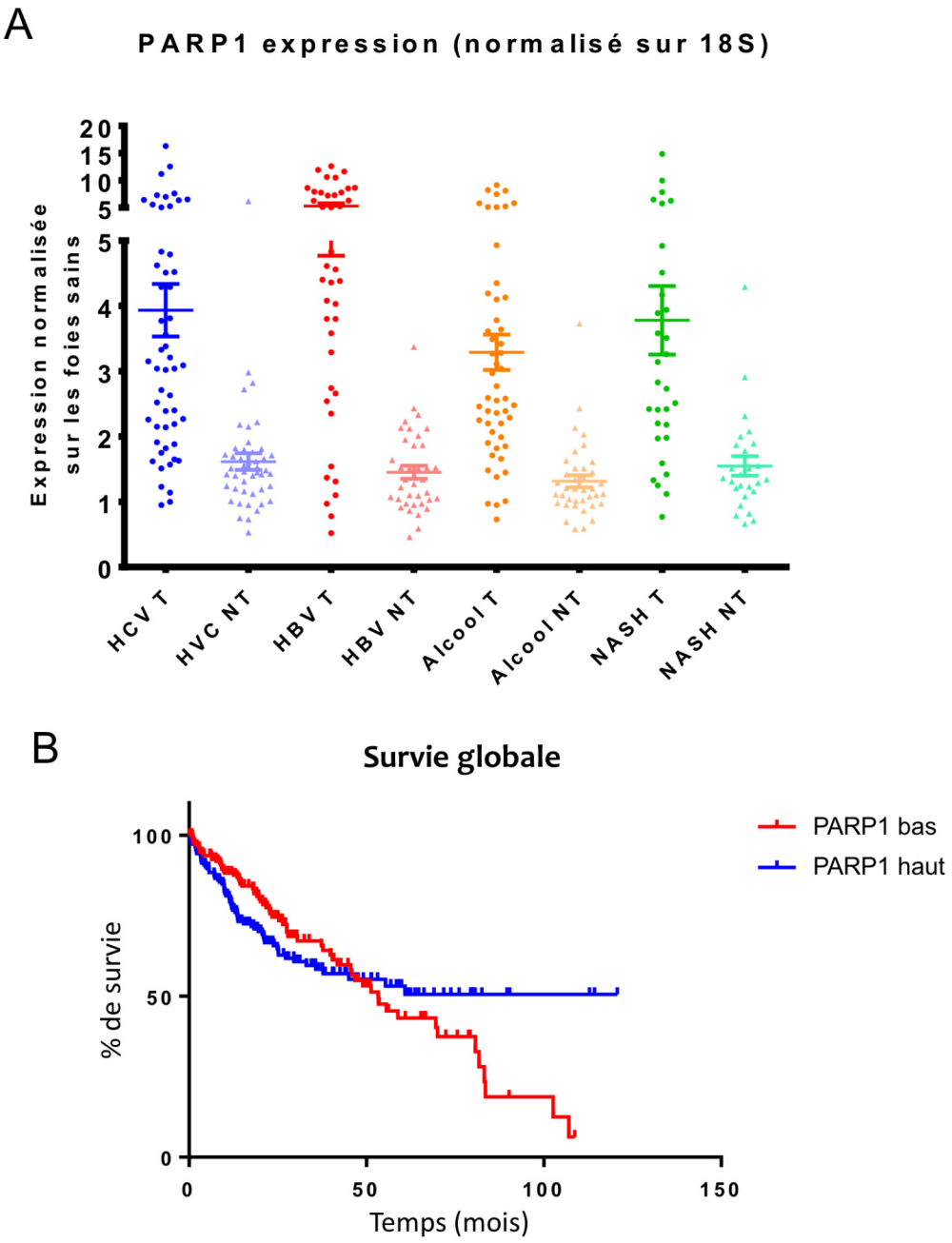


Figure 64 **Niveau d'expression de PARP1 dans les CHC d'étiologies différentes et corrélation de l'expression avec la survie des patients**

*A- **PARP1 est surexprimée dans les échantillons tumoraux.***
L'expression de l'ARNm de PARP1 est normalisée sur le gène du 18S. Les résultats sont présentés en fonction de l'étiologie du CHC et normalisés sur les données de foies sains. Il est possible de comparer l'expression de PARP dans les échantillons tumoraux (T) ou non tumoraux (NT).)

*B- **Courbe de survie des patients en fonction de l'expression de PARP1.***
Les tumeurs sont divisées en deux catégories « PARP1 bas » et « PARP1 haut », estimée en fonction de la médiane d'expression (au-dessus de la médiane ou en dessous). Le suivi clinique des patients nous informe de la survie globale des patients au cours du temps.

Notre équipe a également accès à des cohortes françaises d'échantillons tumoraux et non tumoraux associés. La description de la composition des cohortes vous est présentée pour information en Annexe 3. L'analyse ARN et protéique de ces échantillons en collaboration avec l'Institut Curie (Paris) nous a permis de noter une surexpression nette de PARP1 dans les échantillons tumoraux comparés aux échantillons non tumoraux (FIGURE 64 A). Cette surexpression de PARP1 est corrélée avec une augmentation de la prolifération dans les échantillons (données non montrées). Nous pouvons également observer une tendance quant à une expression plus haute dans les tumeurs associées au HBV que pour les autres étiologies mais les analyses statistiques ne confirment pas cette tendance.

La corrélation entre l'expression de PARP1 et la survie des patients (FIGURE 64 B), semble montrer que l'expression haute de PARP1 à un impact négatif sur la survie des patients dans les 4 premières années. Cette tendance semble s'inverser pour la survie à plus long terme. Néanmoins cette analyse n'est pas significative si l'on applique le test statistique du log rank applicable dans le cas d'étude de survie. Ces données pourront être retravaillées en utilisant un cut off entre les « PARP1 haut » et « PARP1 bas » basé sur les échantillons non tumoraux plutôt que la valeur médiane des données.

Dans l'ensemble ces résultats nous permettent d'affirmer que la majorité des CHC surexpriment la protéine PARP1, apportant une preuve quant à l'intérêt de l'utilisation des inhibiteurs de PARP en combinaison avec la radiothérapie pour le traitement des CHC toutes étiologies confondues. De plus, la surexpression de PARP1 semble plus importante dans les tumeurs d'origine HBV.

VIII.4. Discussion

Nous l'avons vu dans les travaux précédents, le rôle de HBx est indispensable pour la réplication du virus de l'hépatite B et passe par la dégradation du complexe SMC5/6. L'absence du complexe SMC5/6 dans les cellules de mammifères n'est pas beaucoup documentée dans la littérature, mais les études chez la levure indiquent un rôle de SMC5/6 dans les mécanismes de réparation de l'ADN et la réplication du génome. Ceci laisse supposer des conséquences en termes de modulation des voies de réparation de l'ADN dans les cellules infectées.

L'ensemble de nos résultats permettent d'explorer l'impact de l'expression de HBx sur les voies de DDR dans des lignées cellulaires hépatocytaires. Les cellules HepG2.2.15, exprimant la protéine HBx, sont plus sensibles que les HepG2 K6 à la mort cellulaire induite par l'exposition aux RI, à l'utilisation de l'inhibiteur de PARP, Veliparib, et à l'HU.

L'HU est connue pour générer un stress réplicatif dans la cellule en altérant le pool de nucléotides disponibles, or dans notre étude on observe une accumulation des cellules en phase S suite au traitement par HU. Les cellules déplétées pour SMC5/6 semblent avoir un cycle de réplication ralenti, on observe plus de cellules en phase S que dans les conditions contrôles, mais elles sont toujours capables d'activer les points de contrôles de cycle cellulaire. D'un point de vue fonctionnel, les HepG2.2.15 présentent moins de phosphorylation de la protéine RPA, et donc moins d'activation et des taux plus haut de γH2AX, signe de persistance de dommages que les cellules n'exprimant pas HBx (HepG2 K6 ou HepG2) à la suite d'un traitement de 24h à l'HU.

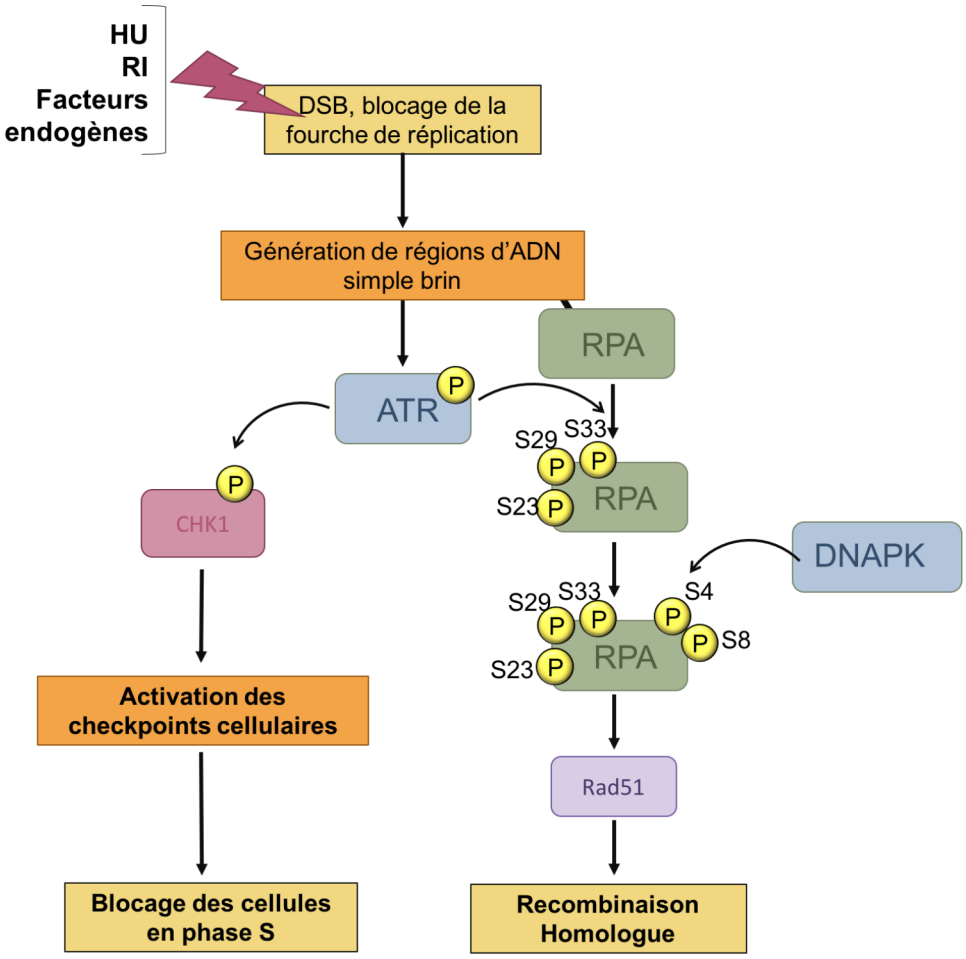


Figure 65 **Schématisation de la voie de signalisation d'ATR et RPA**

Les DSB ou le blocage de la fourche de réplication entraine un stress réplicatif et la génération de régions d'ADN simple brin. Ces régions sont reconnues par RPA. La présence de RPA permet l'activation de ATR qui va pouvoir phosphoryler ses protéines cibles. La phosphorylation de Chk1 permet l'activation des checkpoints cellulaires et peut entrainer un blocage des cellules en phase S. La phosphorylation séquentielle de RPA est activée, ATR phosphoryle au niveau des sérines S23/S29/S33, puis DNAPK conduit à la phosphorylation des sérines S4 et S8. RPA activée, recrute Rad51 et initie la recombinaison homologue pour répondre aux dommages.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que la phosphorylation complète de RPA n'est pas nécessaire à l'activation des checkpoints de la phase S, puisque les HepG2.2.15, en dépit d'un manque d'activation de RPA, s'accumulent en phase S. En revanche, la phosphorylation de RPA est un prérequis indispensable pour le recrutement de Rad51 et le déclenchement de la réparation par HR. De tels profils ont été observés dans d'autres modèles [300, 301]. Ces observations devront être confirmées dans nos modèles cellulaires en analysant les protéines impliquées dans l'activation des checkpoints, notamment la phosphorylation de Chk1 au niveau de S317, ainsi que les phosphorylations séquentielles de RPA (FIGURE 65). L'activation de RPA est un évènement clé des voies de réparation et passe par les phosphorylations des sérines S23, S29 et S33 suivi des sérines S4/S8. Dans notre cas, nos premiers résultats montrent un défaut de l'activation de RPA dans les cellules HepG2.2.15 et une accumulation des dommages à l'ADN. De façon à mieux appréhender les modulations de cette cascade de signalisation, nous avons étudié la phosphorylation de ATR dans les HepG2.2.15 et les HepG2 K6 en réponse à l'HU. Les données préliminaires (non montrées) laissent supposer une activation équivalente dans les deux lignées. Ainsi, les défauts observés pourraient être dus à des défauts d'activation de DNAPK par exemple. Ces hypothèses devront être confirmées. De plus, nous pourrons analyser dans des cellules traitées par HU, les foyers de réparation de Rad51 signes d'une activation de RPA S4/S8 et de l'initiation du mécanisme de HR. (FIGURE 65)

Nous l'avons vu tout au long de ce manuscrit que la présence de la protéine HBx dans une cellule infectée semble déréguler un grand nombre de mécanismes. La réparation de l'ADN fait partie de voies de signalisation potentiellement modulées par HBx, en effet :

- De part, l'interaction entre HBx et DDB1, HBx dérégule le complexe UVDDB, complexe participant de la voie des NER [302]. Le NER est impliqué dans la réparation de différents types de lésions, notamment celles engendrées par les irradiations aux UV ou les adduits à l'ADN carcinogènes tels que ceux induits par l'aflatoxine B1 et connus pour bloquer la transcription.

- HBx interfère avec la voie de NER à travers des mécanismes dépendents de p53 ou indépendants de par sa liaison avec les composants XPB et XPD du facteur de transcription TFIIH et conduit ainsi à augmenter la sensibilité des cellules aux UV [303].

- En raison d'une dérégulation des checkpoints de la phase S, HBx pourrait interférer avec les réparations des crosslinks entre les brins d'ADN (ICL- interstand crosslink) [304].

- Un modèle de souris transgéniques pour étudier les mécanismes de réparation de l'ADN *in vivo* a montré que la présence de HBx n'engendrait pas d'accumulation de dommages à l'ADN de façon spontanée. En revanche, HBx engendrerait une diminution de la réparation de l'ADN induite par l'exposition à des agents mutagènes tel que l'AFB1 [305, 306]. Cette observation est cohérente avec les résultats présentés ici.

De façon à s'affranchir des effets potentiels de HBx sur la réparation de l'ADN, nous allons utiliser des cellules déplétées directement par shARN de la protéine SMC6 afin de déterminer si les modulations des voies de réparation observées sont directement liées à la dégradation de SMC6 par HBx ou engendrées par la présence de HBx et de son interaction avec d'autres facteurs cellulaires.

En se basant sur ces observations, il est possible de supposer que l'expression de HBx dans les tumeurs du foie pourrait être exploitée à des fins thérapeutiques car de telles tumeurs seraient plus sensibles aux traitements combinant RI et inhibiteur de PARP. La présence de HBx dans les CHC est documentée dans plusieurs études [207, 208] mais reste néanmoins controversée. Certaines études laissent supposer des mutations ou délétions importantes dans le gène HBx intégré [307]. Cependant, nous avons pu confirmer dans notre cohorte de patients français la présence de transcrits codant potentiellement pour HBx. Il est difficile d'affirmer que ceux-ci correspondent à des transcrits de HBx en raison du chevauchement des régions codantes dans le génome de HBV, la combinaison de plusieurs couples de primers nous permet de dire que dans 14% de nos échantillons nous amplifions par qPCR uniquement un transcrit spécifique de HBx, et que dans 75% des cas nous amplifions plusieurs régions qui pourraient correspondre à HBx. Nous disposons des échantillons protéiques de la cohorte mais en l'absence d'anticorps HBx efficace il est difficile d'envisager une approche par western blot pour confirmer ces résultats.

Nous avons dans cette étude exploré les effets cytotoxiques de 2 inhibiteurs de PARP, le Talazoparib et le Veliparib. Le Talazoparib montre une efficacité d'action plus importante que le Veliparib sur les lignées étudiées. Les prochaines études viseront à explorer cette différence d'activité dans des lignées exprimant ou non la protéine HBx.
Même si nos approches globales dans les cohortes de patients nous ont permis de noter une surexpression de PARP1 dans les CHC. L'effet cytotoxique des inhibiteurs de PARP ne dépend pas uniquement du taux d'expression de PARP dans les tumeurs mais aussi du profil d'expression des gènes impliqués dans l'élimination des complexes PARP/ADN. Il conviendra d'étudier les mécanismes et les gènes mis en jeux dans cette réparation pour mieux comprendre les phénomènes observés.
Le complexe SMC5/6 est nécessaire à la réparation des lésions dans l'ADN dans les cellules en division, ainsi qu'au maintien des fourches de réplication. Les complexes PARP/ADN vont engendrer un blocage de la réplication. Il est donc possible de supposer un rôle de SMC5/6 dans la réparation de ces lésions qui pourrait expliquer l'augmentation de la sensibilité des cellules à l'inhibiteur de PARP.

Les études précédentes menées au sein de l'équipe ont démontré que l'utilisation de la radiothérapie en tant que traitement pour les CHC pouvait s'avérer efficace dans certaines conditions, notamment en combinaison avec une chimiothérapie à base de doxorubicine. L'étude nationale menée au sein de l'étude TACERTE démontre une efficacité de près de 95% pour les tumeurs de petites tailles (diamètre inférieur à 5cm). Néanmoins, cette efficacité chute à 60% pour les tumeurs d'un diamètre compris entre 5 et 10 cm. L'une des causes possibles de cette résistance aux radiations observée pourrait être l'efficacité accrue des tumeurs à résister aux dommages à l'ADN induits par les radiations ionisantes à savoir les DSB et les SSB, de par, par exemple, la surexpression d'enzymes de voies de réparation. D'où notre approche dans ses travaux visant à combiner les radiations ionisantes avec des inhibiteurs de DDR et notamment des inhibiteurs de PARP.
Une première preuve du concept a été établie par un ancien doctorant de notre équipe, Clément Guillot, qui a démontré que l'utilisation d'inhibiteurs de PARP (PARPi) permettait d'augmenter l'efficacité des irradiations pour des lignées hépatocytaires cancéreuses *in vitro* [230].

Nous confirmons dans cette étude la possibilité d'induire un effet cytotoxique dans les cellules tumorales du foie par la combinaison d'inhibiteur de PARP et de la radiothérapie. Cette approche pourrait être plus efficace chez les patients exprimant la protéine HBx au sein des CHC.

Les données bibliographiques actuelles rapportent des liens entre HBV et PARP1. La publication de Na et al. démontre un lien direct entre HBx et PARP1 et une inhibition de l'activité enzymatique de PARP1 conduisant à l'inhibition de voies de réparation dépendante de PARP et notamment le recrutement de Sirt6 au niveau des lésions de l'ADN. Ainsi l'interaction entre HBx et PARP1 conduirait à une accumulation de dommages dans l'ADN (augmentation des foyers de γH2AX) en réponse à un stress oxydatif. Il est important néanmoins de remarquer que ces études sont réalisées dans un contexte cellulaire particulier [308].
De plus, les inhibiteurs de PARP pourraient engendrer des effets secondaires dans les cellules infectées, en effet l'équipe de Ko et al. [309] a démontré la présence d'un site de liaison de PARP au niveau du promoteur de HBc dans le génome de HBV. La formation d'un complexe PARP/ADN au niveau de ce promoteur par l'utilisation de PARPi, pourrait conduire à une surexpression de protéines virales incompatible avec l'effet thérapeutique espéré. Nous avons débuté l'analyse de ce point en analysant le taux d'expression des protéines virales dans un contexte d'HepaRG infectée en présence de l'inhibiteur de PARP. Les résultats préliminaires ne sont pas concluants quant à l'activation et la surexpression de la transcription virale.

Nous confirmons dans cette étude que HBx semble affecter les voies de réparation de l'ADN mais que HBx n'est pas un oncogène direct. En effet, l'évolution naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite B conduit au carcinome hépatocellulaire à la suite de plusieurs décennies. Il s'agit d'un processus long. HBx bien qu'elle puisse perturber la réparation cellulaire en raison notamment de la dégradation de SMC5/6, n'est pas toxique pour la cellule. L'effet à long terme de HBx s'explique de par la régénération lente des hépatocytes (le temps de vie d'un hépatocyte de canard est de l'ordre de 4 ans). Les cellules quiescentes favorisent la réplication du virus mais l'absence de réplication protège les cellules des dommages à l'ADN induit par la dégradation de SMC5/6. De plus, dans les cellules proliférentes, la réplication virale est fortement diminuée, le taux d'expression de HBx diminue. Ainsi la dégradation de SMC5/6, qui n'est de toute façon jamais totale, est moindre donc moins délétère pour la cellule.

Discussion Générale

Le rôle de HBx dans l'infection par le virus de HBV a longtemps été étudié et est le sujet d'un nombre impressionnant de publications, néanmoins il apparait que les fonctions décrites jusqu'à présent pour HBx n'étaient valables que dans des contextes d'études particuliers basés sur des surexpressions, à des taux bien supérieurs à ceux physiologiques, ou des modèles cellulaires imparfaits (absence de certains facteurs cellulaires et absence de la matrice naturelle de réplication de HBV, l'ADNccc).

Mes travaux reposent sur l'utilisation de modèles d'études proches de la physiologie naturelle d'une infection par HBV, à savoir les cellules primaires du foie (PHH) et une lignée de progéniteurs hépatocytaires, les HepaRG. Ces cellules peuvent être infectées *in vitro* par des virions produits en laboratoire.

Nous avons démontré tout au long de ce manuscrit que HBx est indispensable à la réplication du virus de l'hépatite B. Parmi tous les rôles de HBx décrit dans la littérature nous apportons ici la preuve que HBx agit essentiellement via son interaction avec DDB1 pour contrer la restriction du virus engendrée par le complexe SMC5/6 (étude 2). Le complexe SMC5/6 permet de bloquer la transcription de l'ADN viral au niveau épigénétique (étude 1). Tous les ADN sous forme épisomale semblent ciblés par le complexe SMC5/6, apportant des perspectives futures quant à l'implication de ce complexe dans la régulation d'autres virus à ADN sous forme circulaire.
Ce rôle de SMC5/6 est inattendu, original, et il ouvre de nombreux axes de recherche pour le futur, par rapport aux mécanismes mis en œuvre par le complexe SMC5/6 pour bloquer l'ADN au niveau de sa transcription notamment : Comment SMC5/6 est-il recruté sur l'ADN épisomal ? Par quels moyens engendre-t-il des modifications épigénétiques conduisant au silencing de l'ADN ? Une des hypothèses envisageables repose sur l'observation de l'étude 1 qui démontre que l'ADNccc en l'absence de HBx est plus compacté, le complexe SMC5/6 pourrait alors réprimer la transcription de l'ADN viral via cette compaction.

Dans l'optique de diversifier les modèles animaux (notamment par l'utilisation des macaques), la découverte de la dégradation de SMC5/6 par HBx dans un cycle de réplication du virus « naturel », permet de détecter les cellules permissives à une infection naturelle. Nos premières analyses *in vitro* au sein du laboratoire nous ont permis de confirmer que HBx était capable de dégrader le complexe SMC5/6 simien dans des cellules primaires de foie de macaques (PMH, *Primary Macaca Hepatocyte*)

Le complexe SMC5/6 apparaît donc comme un mécanisme de défense intrinsèque de la cellule pour se défendre face à une infection virale. Finalement, même si les mécanismes mis en jeu ne sont pas encore connus, HBx à la manière de nombreux virus affecte les mécanismes de réparation de l'ADN.

De nombreux virus utilisent et/ou induisent les mêmes cascades protéiques que les voies du DDR. En effet, l'activation des voies de réparation de l'ADN est utilisée par de nombreux virus

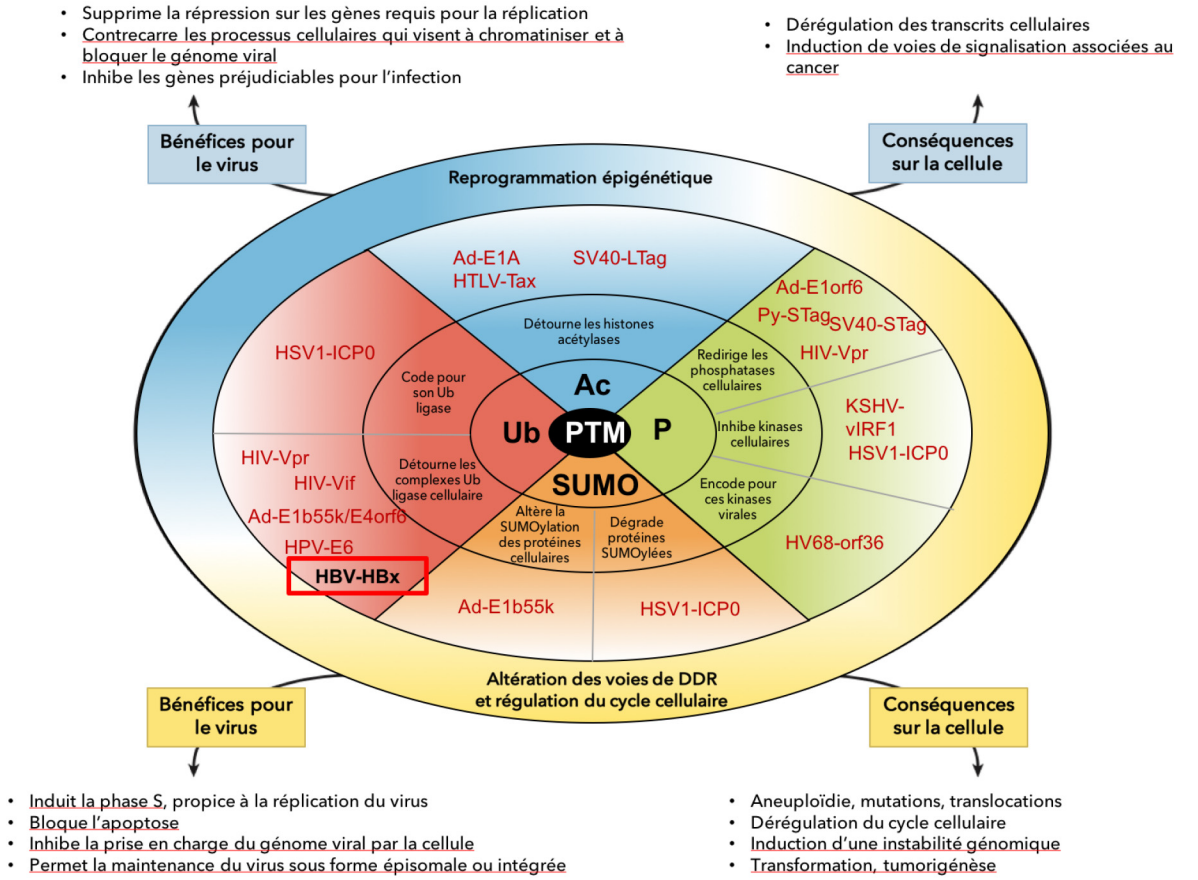


Figure 66 **Détournement des modifications post traductionnelles par les virus.**

Les virus utilisent les modifications post traductionnelles pour détourner 2 grands mécanismes cellulaires, l'épigénétique et les voies de réparation de l'ADN. Ac = acétylation, P = phosphorylation, SUMO= SUMOylation, Ub= Ubiquitination. Le virus HBV participe à ce phénomène par le biais de HBx et de la dégradation de SMC5/6. En rouge (souligné), les principales conséquences de cette dégradation dans le cas du virus HBV.

Figure adaptée de [281]

à ADN (Herpes Simplex virus 1 et 2 (HSV1 et 2), Epstein-Barr virus (EBV), polyomavirus, et le virus 40 simien (SV40)) ou certains virus à ARN (HIV et HCV) [281].
La présence de certaines protéines virales via les modifications cellulaires qu'elles induisent peut conduire à l'activation des voies de signalisation du DDR. En effet celles-ci peuvent (i) perturber le cycle cellulaire et induire la transformation des cellules, c'est le cas de la protéine E7 du virus HSV1 qui active Chk2, (ii) booster la croissance virale via l'induction de checkpoints cellulaires comme ICP0 de HSV1 ou Vpr de HIV1, (iii) ou modifier la chromatine cellulaire, l'architecture du noyau ou de la cellule, par exemple Vpr du HIV1, de par sa liaison avec la chromatine, active ATM [281].

Certains virus exploitent les modifications post traductionnelles et affectent ainsi les signalisations du DDR. En détournant les mécanismes d'ubiquitination, les virus ont la possibilité de dégrader certains facteurs cellulaires. Il existe des protéines virales ayant une activité ubiquitine ligase telles que ICP0 de HSV1, et d'autres qui détournent les ubiquitines ligases cellulaires à la façon de E6 de HPV. Dans ce contexte, HBV, par le biais de HBx et du complexe DDB1/E3 ubiquitine ligase, conduit à l'ubiquitination et la dégradation de SMC5/6.

Dans d'autres cas, le virus ne cherche pas à bloquer les réponses du DDR mais au contraire profite de ces mécanismes et les détournent pour leur propre réplication. Les virus peuvent tirer des bénéfices de DDR, les voies de réparation cellulaires pouvant être exploitées par le virus pour aider à la réplication ou à la recombinaison [281]. (FIGURE 66)

La conséquence logique d'une altération des mécanismes de réparation est l'instabilité génétique et l'apparition de cancers. Les estimations montrent que près de 10 à 20% des cancers dans le monde peuvent être attribués à une infection virale, il existe au moins 6 virus connus pour être associés au cancer : EBV (cause des lymphomes), HPV (cancers cervicaux), HTLVA (leucémie de l'adulte à cellules T), KSHV (sarcome de Kaposi), et enfin HCV et HBV (qui causent les hépatocarcinomes). (FIGURE 66)

Tous ces virus induisent une multitude de modifications dans les cellules qui conduisent à l'instabilité du génome. Le détournement des voies de réparation empêche la réparation des cassures induites via d'autres facteurs. De plus, les virus sont à l'origine d'une reprogrammation épigénétique, en manipulant la chromatine, le virus impacte sur la DDR en affectant la méthylation et/ou l'acétylation des histones ce qui contribue à la transformation [281].

Le rôle de HBx dans l'oncogenèse hépatique a également fait l'objet de nombreuses publications et il en ressort que HBx n'est pas directement oncogénique mais qu'elle favorise l'oncogenèse lorsqu'elle est associée à d'autres agents oncogéniques.
L'implication de HBx dans la dégradation de SMC5/6 confirme cette hypothèse. HBx n'est pas oncogénique mais via la dégradation de SMC5/6 elle pourrait participer au développement tumoral. En effet, HBx et son interaction avec DDB1 ayant déjà démontré son rôle dans l'instabilité génétique [198], et sachant que cette interaction conduit à la dégradation de SMC5/6, impliqué dans les mécanismes de réparation de l'ADN, le rôle potentiel de HBx dans l'oncogenèse hépatique semble étroitement lié à SMC5/6, même si ce phénomène est lent et demande plusieurs décennies avant de l'apparition du CHC.

Les deniers travaux présentés dans ce manuscrit décrivent comment détourner la dégradation de SMC5/6 dans les cellules tumorales de CHC à des fins thérapeutiques en se basant sur le fait que les cellules dépourvues de SMC5/6 sont plus sensibles aux radiations ionisantes et aux inhibiteurs de PARP. En effet, les cellules subissent lors de l'irradiation un grand nombre de cassures simples et doubles brins qui en l'absence de système de réparation efficace dû aux PARPi et à l'absence de SM5/6 ne peuvent pas être réparées et conduisent à la mort de la cellule.

Annexes

RÉFÉRENCES

1. Palmert MR, Boepple PA. Variation in the timing of puberty: clinical spectrum and genetic investigation. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 ; 86 : 2364-8.
2. Parent AS, Franssen D, Fudvoye J, *et al*. Developmental variations in environmental influences including endocrine disruptors on pubertal timing and neuroendocrine control: Revision of human observations and mechanistic insight from rodents. *Front Neuroendocrinol* 2015 ; 38 : 12-36.
3. Franceschini I, Desroziers E. Development and aging of the kisspeptin-GPR54 system in the mammalian brain: What are the impacts on female reproductive function? *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013 ; 4 : 22.
4. Adlanmerini M, Fabre A, Boudou F, *et al*. Effets membranaires du récepteur alpha des œstrogènes : une question de spécificité tissulaire. *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 1083-91.
5. Stavrou I, Zois C, Chatzikyriakidou A, *et al*. Combined estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta genotypes influence the age of menarche. *Hum Reprod* 2006 ; 21 : 554-7.
6. Mendoza N, Morón FJ, Quereda F, *et al*. A digenic combination of polymorphisms within ESR1 and ESR2 genes are associated with age at menarche in the Spanish population. *Reprod Sci* 2008 ; 15 : 305-11.
7. Mayer C, Acosta-Martinez M, Dubois SL, *et al*. Timing and completion of puberty in female mice depend on estrogen receptor alpha-signaling in kisspeptin neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010 ; 107 : 22693-8.
8. Antal MC, Krust A, Chambon P, Mark M. Sterility and absence of histopathological defects in nonreproductive organs of a mouse ERbeta-null mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 ; 105 : 2433-8.
9. Naulé L, Robert, Parmentier C, *et al*. Delayed pubertal onset and pre-pubertal Kiss1 expression in female mice lacking central estrogen receptor beta. *Hum Mol Genet* 2015 ; 24 : 7326-38.
10. Paech K, Webb P, Kuiper GG, *et al*. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* 1997 ; 277 : 1508-10.
11. Gonzales KL, Tetel MJ, Wagner CK. Estrogen receptor (ER) beta modulates ERalpha responses to estrogens in the developing rat ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Endocrinology* 2008 ; 149 : 4615-21.
12. Catteau-Jonard S, Dewailly D, Prévot V, *et al*. L'hormone anti-müllerienne : une hormone ovarienne exerçant une rétroaction hypothalamique ? *Med Sci (Paris)* 2016 ; 32 : 441-4.

NOUVELLE

Virus de l'hépatite B et chromatine

Une protéine virale, HBx, interfère avec la machinerie épigénétique de la cellule

Lise Rivière[1,2], Laetitia Gérossier[3], Olivier Hantz[3], Christine Neuveut[1,2]

[1] Unité des Hépacivirus et immunité innée, Institut Pasteur, 28, rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France ;
[2] UMR CNRS 3569, 28, rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France ;
[3] Inserm U1052, CNRS UMR5, Centre de recherche en cancérologie de Lyon, université de Lyon, F-69000 Lyon, France.
lise.riviere@pei.de
christine.neuveut@pasteur.fr

L'ADNccc du virus de l'hépatite B : une forme virale résistante aux traitements

Dans le monde, environ 300 000 personnes sont chroniquement infectées par le virus de l'hépatite B (VHB) et encourent un risque élevé de développer un carcinome hépatocellulaire [1]. Les traitements antiviraux existant contrôlent efficacement la réplication virale sans toutefois éliminer l'ADN viral nucléaire qui reste présent au sein des cellules infectées. Cet ADN, appelé « ADN circulaire covalemment clos » (ADNccc), est à l'origine de l'expression des gènes viraux et de la production de virus. Ces traitements doivent donc être pris à vie afin d'éviter toute réactivation virale. Le développement de nouveaux traitements visant notamment à éliminer l'ADNccc ou contrôler sa transcription nécessite donc de comprendre les mécanismes qui contrôlent l'expression et le maintien de cet ADNccc.

Les particules du VHB contiennent un génome d'ADN circulaire partiellement double brin (ADN-RC). Au cours de l'infection, le génome, transporté jusqu'au noyau, est converti en ADNccc après action de la machinerie cellulaire (ou de protéines cellulaires). L'ADNccc sert alors de matrice pour la transcription des ARN viraux, dont l'ARN prégénomique qui est encapsidé au niveau du cytoplasme de la cellule infectée et rétrotranscrit en ADN-RC. L'ADNccc n'est pas intégré dans l'ADN cellulaire. Cependant, à l'instar de celui-ci, il est organisé sous forme de chromatine et exploite des mécanismes cellulaires pour réguler sa transcription *(Figure 1)*.

La transcription virale, comme celle des gènes cellulaires, est régulée par des mécanismes de remodelage de la chromatine

L'organisation de l'ADN sous forme de chromatine le rend moins accessible aux facteurs de transcription. L'activation de la transcription des gènes dépend donc de mécanismes permettant d'augmenter l'accessibilité de l'ADN aux facteurs soit en déplaçant les nucléosomes sur l'ADN, soit en réduisant les forces permettant son association aux histones *via* la modification post-traductionnelle (MPT) de ces dernières *(Tableau I)*. Ces modifications reposent sur des enzymes cellulaires dont les histone acétyltransférases (HAT) et les histone méthyltransférases (HMT) qui sont respectivement responsables de l'acétylation et de la méthylation des histones, et les histone déacétylases (HDAC) et histone déméthylases (HDM) qui effacent ces marques.

La transcription de l'ADNccc semble également régulée par des modifications post-traductionnelles touchant les histones. En effet, chez des patients chroniquement infectés par le VHB, une corrélation est observée entre virémie et niveau d'acétylation des histones qui sont associées à l'ADNccc [2]. L'activation de la transcription de l'ADNccc est aussi contrôlée par les HAT CBP (*CREB binding protein*)/P300 et par

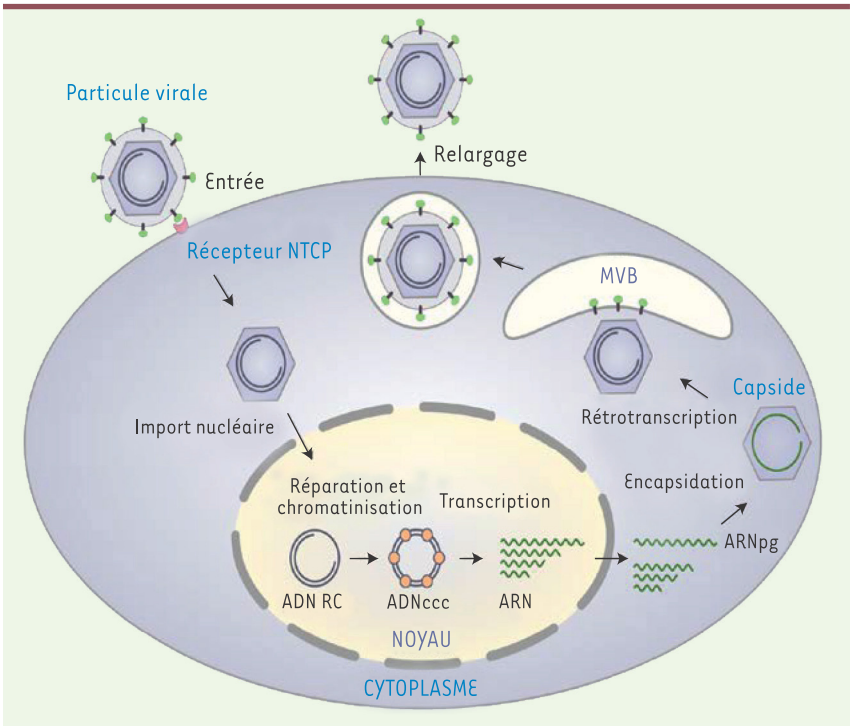


Figure 1. ***Cycle de réplication du VHB.*** La particule virale contenant l'ADN viral partiellement double brin (ADN-RC) entre dans la cellule suite à son interaction avec le récepteur : le *sodium-taurocholate cotransporting polypeptide* (NTCP). La capside contenant le génome viral est ensuite importée dans le noyau où l'ADN viral est libéré. L'ADN-RC est alors réparé par des facteurs cellulaires et converti en ADNccc. L'ADNccc s'associe avec des protéines cellulaires histones en une structure chromatinienne. Il est alors transcrit en ARN, permettant la production des protéines virales. L'ARN prégénomique est encapsidé dans les capsides néosynthétisées et rétrotranscrit en ADN-RC. Après acquisition d'une enveloppe au niveau des corps multivésiculaires (MVB), les nouvelles particules virales sont relarguées de la cellule par exocytose. ADN-RC : ADN relâché circulaire ; ADNccc : ADN circulaire covalemment clos ; ARNpg : ARN prégénomique.

l'acétylation des histones H3 et H4. Une étude récente a de plus cartographié les modifications des histones associées à l'ADNccc. Elle montre l'existence d'une corrélation entre ces MPT activatrices et l'activité transcriptionnelle des promoteurs du virus [2-5].

La protéine régulatrice virale HBx : une petite protéine, pilier indispensable de la transcription virale *in vivo*

La protéine virale régulatrice HBx est essentielle à la réplication virale. Elle agit principalement en activant la transcription du VHB. Ainsi, son rôle dans la régulation de la chromatine de l'ADNccc a été suggéré. Le recrutement d'HBx sur l'ADNccc est en effet corrélé avec celui des HAT CBP/P300 et du facteur PCAF (*P300/CBP-associated factor*), ainsi qu'avec l'acétylation des histones et l'activation transcriptionnelle du VHB [3]. Nous avons montré qu'HBx interagit avec des facteurs cellulaires qui sont impliqués dans la régulation de la transcription et de la chromatine dont elle modifie l'activité. C'est le cas de CBP/P300, de PRMT1 (*protein arginine N-methyltransferase 1*) ou du complexe HDAC1 (*histone deacetylase 1*)/PP1 (*protein phosphatase 1*) [4, 6, 7]. Cependant l'absence de modèles cellulaires permissifs à l'infection a longtemps retardé l'étude du rôle d'HBx dans la régulation épigénétique dans le contexte de l'infection.

Rôle d'HBx dans le contexte de l'infection par le VHB : HBx contrecarre la répression transcriptionnelle de l'ADNccc médiée par la voie SETDB1/HP1/H3K9me3

L'étude que nous avons réalisée portait sur le rôle d'HBx dans la transcription de l'ADNccc dans le contexte de l'infection par le virus. Des hépatocytes humains primaires ainsi qu'une lignée cellulaire

Type d'histone	Acide aminé modifié	Modification	Abréviation	Conséquence
H3	lysines 4, 9, 14, 18	acétylation	H3ac	activation de la transcription
H4	lysines 5, 8, 12, 16	acétylation	H4ac	activation de la transcription
H3	lysine 4	méthylation	H3K4me	activation de la transcription
H3	lysine 9	méthylation	H3K9me	inhibe la transcription
H3	lysine 27	méthylation	H3K27me	inhibe la transcription

Tableau I. ***Principales modifications post-traductionnelles (MPT) de type acétylation et méthylation des histones et leurs conséquences sur la transcription.***

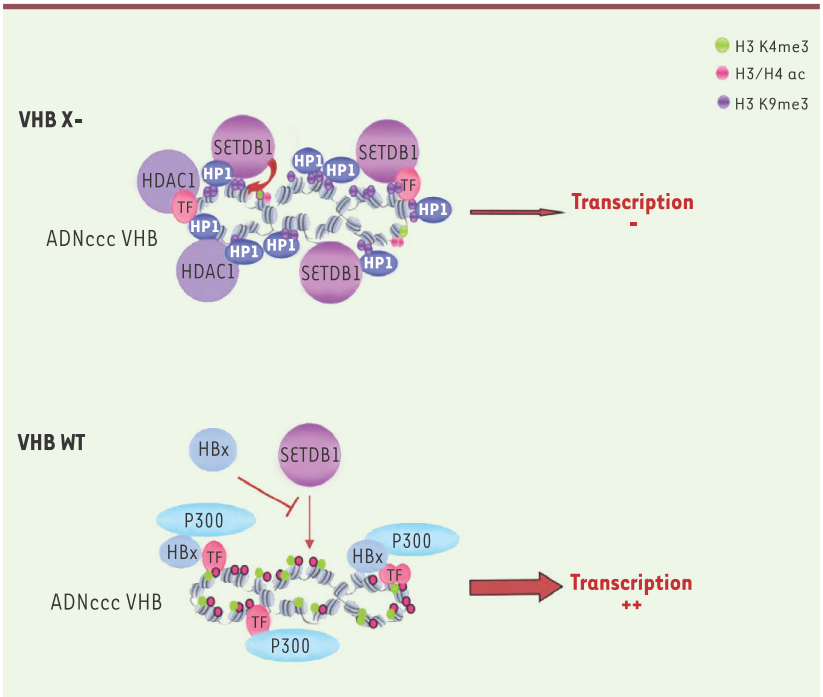


Figure 2. ***HBx contrecarre la répression transcriptionnelle de l'ADNccc médiée par la voie SETDB1/HP1/H3K9me3.*** En l'absence d'HBx (VHB X-), la transcription du virus est réprimée *via* la déacétylation des histones, la mise en place des marques répressives H3K9me3 par SETDB1 et le recrutement des facteurs répresseurs HP1. L'expression d'HBx contrecarre l'activité de SETDB1 inhibant le positionnement des marques répressives H3K9me3 et permettant l'établissement de marques activatrices de la transcription comme l'acétylation des histones et la mise en place des marques H3K4me3, aboutissant ainsi à une forte transcription virale. ADNccc : ADN circulaire covalemment clos ; HBx : protéine X du virus de l'hépatite B ; SETDB1 : *SET domain, bifurcated 1* ; HP1 : *heterochromatin protein 1* ; H3K9me3, H3K4me3 : histone 3 triméthylée au niveau de la lysine 9 ou 4 respectivement ; H3/H4 ac : histones H3/H4 acétylées ; HDAC1 : histone déacétylase 1 ; TF : facteur de transcription ; VHB WT : virus de l'hépatite B sauvage.

permissive à l'infection par le VHB (les cellules HepaRG[1] différenciées) ont été utilisés. Nous avons suivi la réplication et la transcription virales après infection de ces cellules soit par un virus sauvage (VHB wt), soit par un virus déficient pour l'expression d'HBx (VHB X-). Les résultats que nous avons obtenus ont permis de confirmer que la transcription du virus VHB était réprimée en l'absence d'HBx.

Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la transcription des gènes de VHB, nous avons étudié la structure de l'ADNccc formé après infection des cellules par le VHB wt ou le virus muté VHB X-. En évaluant la sensibilité de l'ADNccc à la digestion par la nucléase micrococcale, nous avons pu montrer que l'ADNccc du VHB X- était plus résistant à la digestion que l'ADNccc du VHB wt. Ceci suggérait que l'ADNccc du virus VHB X- présentait une structure plus compacte, et donc moins accessible à la machinerie de transcription que celui du virus sauvage, un résultat pouvant expliquer, en partie, sa faible transcription.

Différents mécanismes interviennent dans la modulation de la chromatine dont les MPT des histones. Par immunoprécipitation de la chromatine, associée à des PCR quantitatives, nous avons montré que les histones, associées à l'ADNccc du VHB wt, présentaient des modifications activatrices (H3ac, H3K4me3). En revanche, sur l'ADNccc du virus muté VHB X-, nous avons observé un enrichissement en modifications répressives, notamment H3K9me2 et H3K9me3. Ces modifications, notamment retrouvées au niveau de l'hétérochromatine, permettent le recrutement des protéines cellulaires HP1 (*heterochromatin protein 1*), qui amplifient la répression transcriptionnelle. Nous avons observé que les 3 isoformes de ces protéines (HP1α, γ et β) étaient recrutées de façon plus importante sur l'ADNccc du VHB X-.

L'enzyme cellulaire responsable de la méthylation répressive H3K9me3 de l'ADNccc du VHB X- a été déterminée après extinction, par la technique d'ARN interférence, de l'expression de chacune des trois HMT cellulaires susceptibles d'induire une telle modification : suv39H1, suv39H2 et SETDB1. Nos résultats montrent que seule la déplétion de SETDB1 réduit significativement la méthylation H3K9me3 et permet de restaurer partiellement la transcription du VHB X-, suggérant ainsi que SETDB1 est impliquée dans la répression transcriptionnelle du virus muté.

Ayant montré qu'HBx pouvait interférer avec la mise en place de la répression transcriptionnelle de l'ADNccc, sa capacité à contrecarrer cette répression une fois qu'elle a été établie, a ensuite été examinée. Sept jours après leur infection par le VHB X-, les cellules infectées ont donc été transduites avec un vecteur lentiviral contenant le gène codant HBx. Les résultats montrent qu'HBx restaure la transcription du VHB X- et que cette transcription est corrélée à une diminution des marques répressives H3K9me3 et du recrutement d'HP1, et à une augmentation des marques activatrices.

Conclusion

Nos connaissances sur la biologie de l'ADNccc sont encore très limitées en raison de l'absence durant des décennies de modèles permissifs à l'infection par le VHB et la formation de l'ADNccc. Nos travaux ont permis de montrer que, dans le contexte de l'infection, HBx est nécessaire à la transcription de l'ADNccc. Il permet l'établissement d'une chromatine

[1] Ces cellules ont été obtenues à partir d'une tumeur isolée d'une patiente présentant un hépatocarcinome.

transcriptionnellement active *(Figure 2)* [8]. Des travaux récents suggèrent que HBx interfère avec la réponse cellulaire antivirale qui réprime la transcription virale [9, 10]. Nos résultats permettent de mieux comprendre les mécanismes de cette répression. Ils suggèrent qu'elle est mise en place, en partie, *via* l'établissement d'une chromatine réprimée reposant sur des mécanismes associant SETDB1/HP1/H3K9me3. De nombreuses questions restent cependant à résoudre : quels sont les mécanismes cellulaires impliqués dans la reconnaissance de l'ADNccc ? Par quel mécanisme SETDB1 est-elle recrutée sur l'ADNccc et inhibée en présence d'HBx ; HBx cible-t-elle directement SETDB1, ou un de ses partenaires, ou agit-elle sur des facteurs situés plus en amont et responsables de la détection de l'ADN viral et de sa répression transcriptionnelle ? ◊

Hepatitis B virus and chromatin remodeling: HBx counteracts SETDB1/HP1/H3K9me3 transcriptional silencing

RÉFÉRENCES

1. Buendia MA, Neuveut C. Hepatocellular carcinoma. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015; 5 : a021444.
2. Pollicino T, Belloni L, Raffa G, *et al.* Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones. *Gastroenterology* 2006 ; 130 : 823-37.
3. Belloni L, Pollicino T, De Nicola F, *et al.* Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 106 : 19975-9.
4. Cougot D, Wu Y, Cairo S, *et al.* The hepatitis B virus X protein functionally interacts with CREB-binding protein/p300 in the regulation of CREB-mediated transcription. *J Biol Chem* 2007 ; 282 : 4277-87.
5. Tropberger P, Mercier A, Robinson M, *et al.* Mapping of histone modifications in episomal HBV cccDNA uncovers an unusual chromatin organization amenable to epigenetic manipulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015 ; 112 : E5715-24.
6. Benhenda S, Ducroux A, Riviere L, *et al.* The PRMT1 methyltransferase is a binding partner of HBx and a negative regulator of hepatitis B virus transcription. *J Virol* 2013 ; 87 : 4360-71.
7. Cougot D, Allemand E, Riviere L, *et al.* Inhibition of PP1 Phosphatase Activity by HBx: A Mechanism for the Activation of Hepatitis B Virus Transcription. *Sci Signal* 2012 ; 5 : ra1.
8. Riviere L, Gerossier L, Ducroux A, *et al.* HBx relieves chromatin-mediated transcriptional repression of hepatitis B viral cccDNA involving SETDB1 histone methyltransferase. *J Hepatol* 2015 ; 63 : 1093-102.
9. Lucifora J, Arzberger S, Durantel D, *et al.* Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J Hepatol* 2011 ; 55 : 996-1003.
10. Van Breugel PC, Robert EI, Mueller H, *et al.* Hepatitis B virus X protein stimulates gene expression selectively from extrachromosomal DNA templates. *Hepatology* 2012 ; 56 : 2116-24.

NOUVELLE

Défaillances cardiaques d'origine mitochondriale

Une question de régime ?

Paule Bénit, Pierre Rustin

Inserm UMR1141, Hôpital Robert Debré, 48, boulevard Sérurier, 75019 Paris, France.
pierre.rustin@inserm.fr

> La structure fluide du réseau mitochondrial permet d'assurer, de façon spécifique en tous points de la cellule, les nombreuses fonctions métaboliques et la production d'ATP. À tout moment, la structure de ce réseau dépend de l'équilibre entre phénomènes de fusion et de fission des mitochondries, contrôlés par une série de protéines dont on commence à découvrir l'importance dans divers processus physiologiques et pathologiques [1-4] (➜).

(➜) Voir les Synthèses de C. Sauvanet *et al.*, *m/s* n° 10, octobre 2010, page 823 et de E. Sarzi et A. Rötig, *m/s* n° 2, février 2010, page 171

Il a ainsi été montré que la maturation anormale de la protéine OPA1 (*optic atrophy 1*, une guanosine triphosphatase de type dynamine) et la fragmentation mitochondriale qu'elle entraîne sont à l'origine d'une insuffisance cardiaque chez la souris [5]. Cette démonstration est basée sur l'utilisation de cinq modèles murins caractérisés par la délétion homozygote de l'un ou des deux (double mutant) gènes codant les protéases YME1L (*i-AAA protease*) et OMA1 (*IM peptidase*), toutes deux connues pour réguler la protéolyse de la protéine OPA1 [6]. Cette délétion conditionnelle est soit ubiquitaire, touchant tout l'organisme, soit spécifique du tissu cardiaque ou du muscle squelettique, soit encore simultanée dans ces deux tissus.

Un rôle vital pour la protéase YME1L qui contrôle le devenir de la protéine OPA1, un facteur clé de la morphologie mitochondriale

Initialement, grâce à l'utilisation d'une lignée de souris exprimant une Cre recombinase[1] sous le contrôle du promoteur ubiquitaire de l'actine-β, une délétion homozygote soit d'*Yme1l*, soit d'*Oma1*, a été d'abord obtenue dans tous les tissus. Alors que les souris *Oma1*$^{-/-}$ naissent suivant les lois de Mendel, aucune souris *Yme1l*$^{-/-}$ n'est viable. De fait, dès le stade E 8,5[2], les embryons *Yme1l*$^{-/-}$ montrent un retard de croissance spectaculaire et présentent des battements cardiaques altérés. Aucune souris homozygote *Yme1l*$^{-/-}$ n'est obtenue au-delà d'E 13,5 soulignant le rôle vital d'YME1L.

[1] Le système de recombinaison Cre-Lox utilise l'enzyme recombinase Cre, une tyrosine recombinase issue du bactériophage P1, afin de cibler des séquences loxP (également issues du bactériophage P1), permettant ainsi d'activer, réprimer, voire même échanger, les gènes situés entre les séquences lox.

[2] Correspondant au jour 8,5 de développement embryonnaire.

DOI : 10.1051/medsci/20163205011

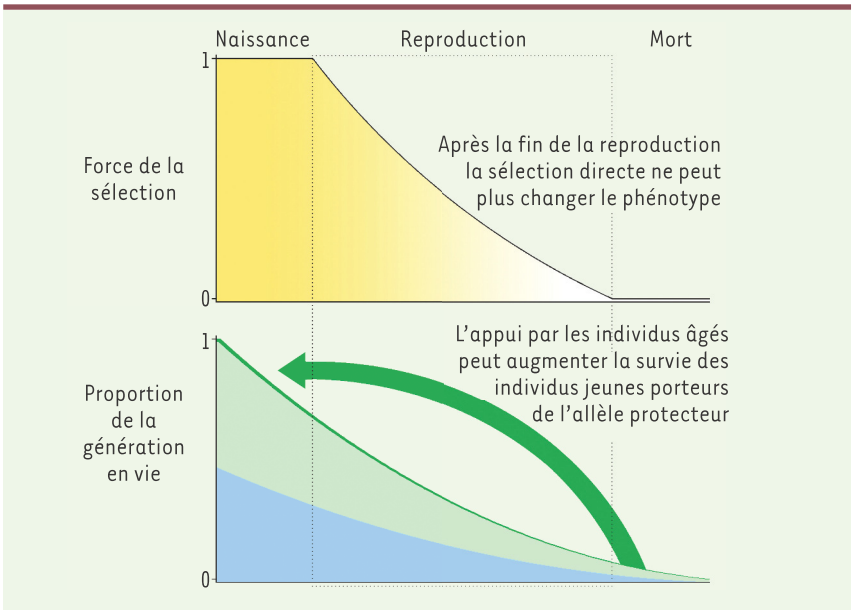


Figure 2. ***Régime de force de la sélection naturelle au cours de la vie, proportion de la génération en vie et impact de l'appui par les personnes âgées sur leur parentèle très jeune.*** La force de sélection diminue avec l'âge (en jaune). Les allèles contribuant à des phénotypes qui ne sont exprimés qu'après la reproduction ne sont pas soumis à la sélection. Ainsi, lorsque la durée de vie reproductive est terminée, la sélection ne fonctionne plus. Toutefois, les personnes âgées qui sont protégées du déclin cognitif (en vert) peuvent encore diriger leur appui envers des individus plus jeunes. Lorsque ces avantages sont dirigés principalement à d'autres qui portent également le même allèle protecteur (la parentèle), la fréquence de l'allèle protecteur peut augmenter par la sélection de parentèle (en vert foncé).

RÉFÉRENCES

1. Varki NM, Strobert E, Dick EJJ, *et al.* Biomedical differences between human and nonhuman hominids: potential roles for uniquely human aspects of sialic acid biology. *Annu Rev Pathol* 2011 ; 6 : 365-93.
2. Crocker PR, Paulson JC, Varki A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2007 ; 7 : 255-66.
3. Malik M, Simpson JF, Parikh I, *et al.* CD33 Alzheimer's risk-altering polymorphism, CD33 expression, and exon 2 splicing. *J Neurosci* 2013 ; 33 : 13320-5.
4. Bradshaw EM, Chibnik LB, Keenan BT, *et al.* CD33 Alzheimer's disease locus: altered monocyte function and amyloid biology. *Nat Neurosci* 2013 ; 16 : 848-50.
5. Schwarz F, Springer SA, Altheide TK, *et al.* Human-specific derived alleles of CD33 and other genes protect against postreproductive cognitive decline. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016 ; 113 : 74-9.
6. Somel M, Franz H, Yan Z, *et al.* Transcriptional neoteny in the human brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 106 : 5743-8.
7. Enard D, Depaulis F, Roest Crollius H. Points chauds de sélection positive dans les génomes de primates. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 579-81.
8. Springer SA, Schwarz F, Altheide TK, *et al.* Reply to Liu and Jiang: Maintenance of postreproductive cognitive capacity by inclusive fitness. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016 ; 113 : E1591-2.

NOUVELLE

Identification d'un nouveau facteur de restriction contre l'infection par le virus de l'hépatite B

Le complexe SMC5/6

Laetitia Gerossier[1], Adrien Decorsière[2], Fabien Abdul [2], Olivier Hantz[1]

[1] Centre de recherche en cancérologie de Lyon (CRCL), Inserm U1052, CNRS 5286, université de Lyon, 151, cours Albert Thomas, 69424 Lyon Cedex, France ; [2] Department of microbiology and molecular medicine, university medical centre (CMU), rue Michel Servet 1, 1211 Genève 4, Suisse.
laetitia.gerossier@inserm.fr

› L'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) constitue un problème majeur de santé publique. En effet, malgré l'existence d'un vaccin préventif efficace, environ 240 millions de personnes sont infectées de façon chronique par le virus au niveau mondial. La situation de porteur chronique du VHB est associée à un risque élevé de développer de graves pathologies du foie comme la cirrhose ou le carcinome hépatocellulaire (CHC). Le CHC représente 95 % des tumeurs malignes primitives du foie, pour lesquelles il n'existe que peu d'options de traitement, et est responsable de 6 000 décès par an en France. L'incidence du CHC augmente du fait des infections virales, notamment celles par le virus de l'hépatite B, associées à presque la moitié des cas de CHC au niveau mondial [1].

m/s n° 10, vol. 32, octobre 2016
DOI : 10.1051/medsci/20163210006

Les traitements actuels contre l'hépatite B ne suffisent pas et ne permettent pas d'arrêter l'évolution vers la cirrhose et le cancer car l'ADN viral n'est pas éliminé des cellules [2]. Le VHB se maintient dans la cellule par formation d'un mini chromosome viral (ou ADNccc pour ADN circulaire clos de façon covalente) utilisé comme matrice pour la transcription des ARN messagers (ARNm) et de l'ARN pré-génomique du VHB. La formation et le maintien de l'ADNccc est l'élément clé qui permet au virus de persister de façon chronique dans le foie des personnes infectées. De ce fait, l'ADNccc représente une cible thérapeutique importante.

La protéine HBx : élément clé de la transcription virale

La protéine régulatrice HBx (protéine X du VHB) possède des activités pléiotropes faisant intervenir des interactions avec de multiples partenaires cellulaires nucléaires ou cytoplasmiques (pour revue voir [3]). Parmi les rôles attribués à HBx, on distingue des implications dans de nombreux processus cellulaires tels que la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose ou des mécanismes de réparation de l'ADN.

Au niveau viral, HBx est aujourd'hui reconnue comme jouant un rôle déterminant dans le maintien de l'activité transcriptionnelle de l'ADNccc. L'absence de HBx inhibe la transcription de l'ADN viral et ainsi la réplication du virus. Les données les plus récentes montrent que HBx module l'activité transcriptionnelle et les modifications épigénétiques [4] (➜). Nos travaux précédents ont montré que HBx, en plus de son action sur la stimulation de la transcription du génome du VHB, permet la transcription de toutes les matrices d'ADN sous forme épisomale[1]. Cette capacité de HBx est liée à son interaction avec DDB1 (*DNA damage-binding protein 1*) [5], un composant d'un complexe E3 ubiquitine ligase[2], qui joue un rôle crucial dans de nombreux processus cellulaires, incluant réplication, réparation de l'ADN et régulation de la chromatine. Dans ce complexe, DDB1 sert de protéine adaptatrice recrutant, directement ou indirectement, les protéines qui vont être ubiquitinées par la E3 ligase et dégradées par le protéasome [6]. Cependant la cible cellulaire de ce complexe HBx-DDB1-E3 ubiquitine ligase était jusqu'à présent inconnue.

(➜) Voir la Nouvelle de L. Rivière *et al.*, *m/s* n° 5, mai 2016, page 455

Identification du complexe SMC5/6 comme partenaire de HBx

L'identification de la cible de HBx s'est avérée particulièrement difficile, sans doute parce que l'interaction entre HBx et cette dernière est très transitoire dans des conditions naturelles. Pour pallier ce problème, nous avons mis en place une stratégie consistant à bloquer l'ubiquitination de la cible tout en maintenant la liaison entre DDB1 et HBx [7]. Pour cela, nous avons fusionné la protéine HBx avec un mutant de DDB1, incapable de s'incorporer au complexe E3 ubiquitine ligase. Cette protéine de fusion conserve sa capacité de fixation à la cible mais celle-ci n'est plus détruite. Une purification par chromatographie d'affinité suivie d'une analyse en spectrométrie de masse a permis d'identifier cette cible. De façon remarquable, les 6 protéines composant le complexe SMC5/6 (*structural maintenance of chromosomes proteins 5/6*) ont été retrouvées associées à la protéine de fusion HBx-DDB1 : les 2 protéines SMC 5 et SMC 6 ainsi que les 4 protéines NSE (*non SMC element*) *(Figure 1)*.

Dans des hépatocytes primaires humains infectés *in vitro* par un VHB sauvage, nous avons pu montrer que SMC5/6 est dégradé par HBx *via* son interaction avec le complexe DDB1-E3 ubiquitine ligase. L'utilisation d'un virus muté pour l'expression de HBx montre qu'en l'absence de HBx, SMC5/6 se fixe sur l'ADN épisomal du virus bloquant sa transcription. En provoquant sa dégradation, HBx active la transcription virale et permet la réplication du VHB *(Figure 2)*. Cette dégradation implique DDB1 (ce qui est montré par l'utilisation de siARN [*small interfering RNA*] contre DDB1) et l'E3 ubiquitine ligase (qui peut être bloquée par le MNL4924, inhibiteur de la neddylation[3]).

Ce phénomène ne serait pas limité au VHB mais concernerait tout l'ADN épisomal comme le suggéraient nos travaux précédents [8]. SMC5/6 se fixe sur l'ADN épisomal et réprime sa transcription. La dégradation de SMC6 par HBx, ou artificiellement par des shARN (*small hairpin RNA*), provoque la destruction du complexe et restaure la transcription de cet ADN extra-chromosomique.

L'ensemble de ces résultats montre que le VHB utilise HBx pour dégrader un facteur cellulaire limitant sa capacité réplicative et que SMC5/6 agit comme un facteur de restriction[4]. Ces mécanismes sont retrouvés pour plusieurs virus : la protéine V du paramyxovirus[5] SV5 (*simian virus 5*) se fixe à DDB1 pour permettre la dégradation de STAT (*signal transducer and activator of transcription*) et ainsi lutter contre les réponses interférons [9] (➜) ; la protéine virale X (Vpx) du virus de l'immunodéficience humaine de type 2 (VIH-2) et simienne (SIV, *simian immunodeficiency virus*) détourne un partenaire cellulaire et le complexe DDB1/E3 ubiquitine ligase pour dégrader le facteur de restriction SMADH1 (*SAM [sterile alpha motif] domain and HD domain-containing protein 1*) afin d'augmenter le *pool* de nucléotides

(➜) Voir la Nouvelle de G. Maarifi *et al.*, *m/s* n° 2 février 2016, page 141

[1] Un épisome est une molécule d'ADN extra-chromosomique circulaire pouvant se répliquer de façon autonome.

[2] L'ubiquitination s'effectue en trois étapes : activation de l'ubiquitine par la formation d'une liaison thioester avec une enzyme activatrice de l'ubiquitine (E1), puis transfert de l'ubiquitine sur une enzyme de conjugaison à l'ubiquitine (E2), et enfin transfert de l'ubiquitine sur la protéine cible, catalysé par une ubiquitine ligase (E3) qui forme la liaison peptidique entre l'ubiquitine et un résidu lysine ou la méthionine aminoterminale de la protéine cible.

[3] Modification protéique post-traductionnelle proche de l'ubiquitination, impliquant la protéine NEDD8.

[4] Protéine cellulaire bloquant la réplication virale.

[5] Famille de virus à ARN simple brin et polarité négative, incluant par exemple les oreillons et la rougeole.

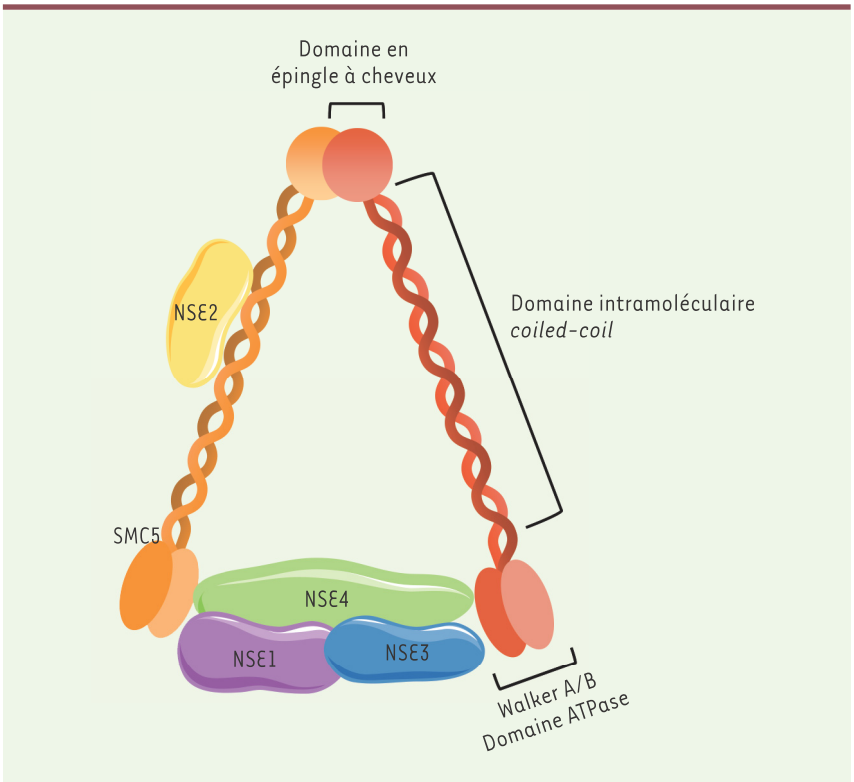


Figure 1. ***Représentation schématique du complexe SMC5/6.*** Le complexe SMC5/6 appartient à la famille des SMC (*structural maintenance of chromosomes*). Le complexe est composé de 2 protéines SMC5 et SMC6 formant un hétérodimère. Chaque SMC contient aux extrémités N-terminale et C-terminale un domaine globulaire contenant respectivement les motifs ATPase Walker A et Walker B (des motifs à la structure tridimensionnelle hautement conservée). Ces deux régions sont reliées par une longue queue avec des motifs *coiled-coil* (superhélice). Cette région est séparée en deux par un motif en épingle à cheveu permettant le repliement de la protéine et la formation d'un domaine ATPase fonctionnel. SMC 5 et SMC 6 sont associées à 4 protéines NSE (*non SMC element*) portant des activités enzymatiques (activité E3 ubiquitine ligase et activité E3 SUMO ligase) (adapté de [12]).

disponibles et ainsi faciliter la synthèse de l'ADN viral [10] (➜) ; en revanche, le virus de l'herpès simplex utilise sa protéine ICP0 (*infected cell polypeptide 0*), ayant sa propre activité ubiquitine ligase, pour dégrader les corps nucléaires PML (*promyelocytic leukaemia nuclear bodies*) séquestrant le virus [11].

(➜) Voir la Nouvelle de H. Lahouassa *et al.*, *m/s* n° 11 novembre 2012, page 909

Questions en suspens

Une première question est : quelle est la cible directe du complexe E3 ubiquitine ligase ? En effet, toutes les sous-unités du complexe SMC5/6 ont été retrouvées associées au complexe HBx/DDB1. Tout le complexe SMC5/6 semble dégradé par la présence de HBx, mais il est connu que l'absence d'un seul de ses composants le déstabilise entièrement. Nous n'avons pas pu identifier, en l'absence d'anticorps adéquats, la protéine directement ubiquitinée par le complexe HBx/DDB1/E3 ubiquitine ligase.

Par ailleurs, quel est le rôle de SMC5/6 sur l'ADNccc ? Les mécanismes mis en jeu pour bloquer la transcription restent à élucider. SMC5/6 permet-il le recrutement de facteurs de remodelage de la chromatine entraînant des modifications post-traductionnelles des histones conduisant au blocage de l'ADN ? Ou est-ce que SMC5/6 permet de relocaliser l'ADN étranger ? Il a été montré que le complexe SMC5/6 est colocalisé avec les corps nucléaires PML. Il est donc possible d'imaginer que SMC5/6 recrute l'ADN viral ou épisomal pour le séquestrer au niveau de ces corps nucléaires.

Une dernière interrogation subsiste quant à l'origine de HBx en début d'infection. Aucune étude, à notre connaissance, n'a montré la présence de la protéine HBx dans la particule virale. Or comment expliquer la levée de l'inhibition de la transcription de l'ADNccc en l'absence de HBx ? En effet, la synthèse de HBx nécessite la transcription de l'ADNccc, elle-même bloquée par SMC5/6. Peut-on imaginer que le transcrit de HBx échappe à l'inhibition de transcription ? Ou que le temps nécessaire au recrutement de SMC5/6 sur l'ADNccc suffise à la transcription précoce du gène *X* viral ? Toutes ces questions demeurent et ouvrent de nombreuses pistes de recherche.

La dégradation de SMC5/6 : quelles conséquences pour la cellule ?

Le rôle de facteur de restriction est nouveau pour le complexe SMC5/6. En effet, SMC5/6 appartient au groupe de protéines SMC (*structural maintenance of chromosomes*) au même titre que la cohésine (composée par les protéines SMC1/3) et la condensine (SMC2/4), respectivement impliquées dans la cohésion et la condensation des chromatides. Le rôle du complexe SMC5/6 n'est pas totalement défini, d'où l'absence d'un nom plus suggestif. Néanmoins, une des fonctions de SMC5/6 connue, bien que contestée, est sa participation dans les réponses aux dommages à l'ADN (DDR, pour *DNA damage response*) [12] en agissant comme plate-forme permettant le recrutement de protéines aux points de cassures de l'ADN [13]. Ceci implique que la dégradation de SMC5/6 par HBx pourrait avoir un impact sur la structure de la chromatine et influencer la DDR. Il est également connu que l'absence de SMC5/6 dans les souris est létale lors des stades précoces de développement. Les changements de

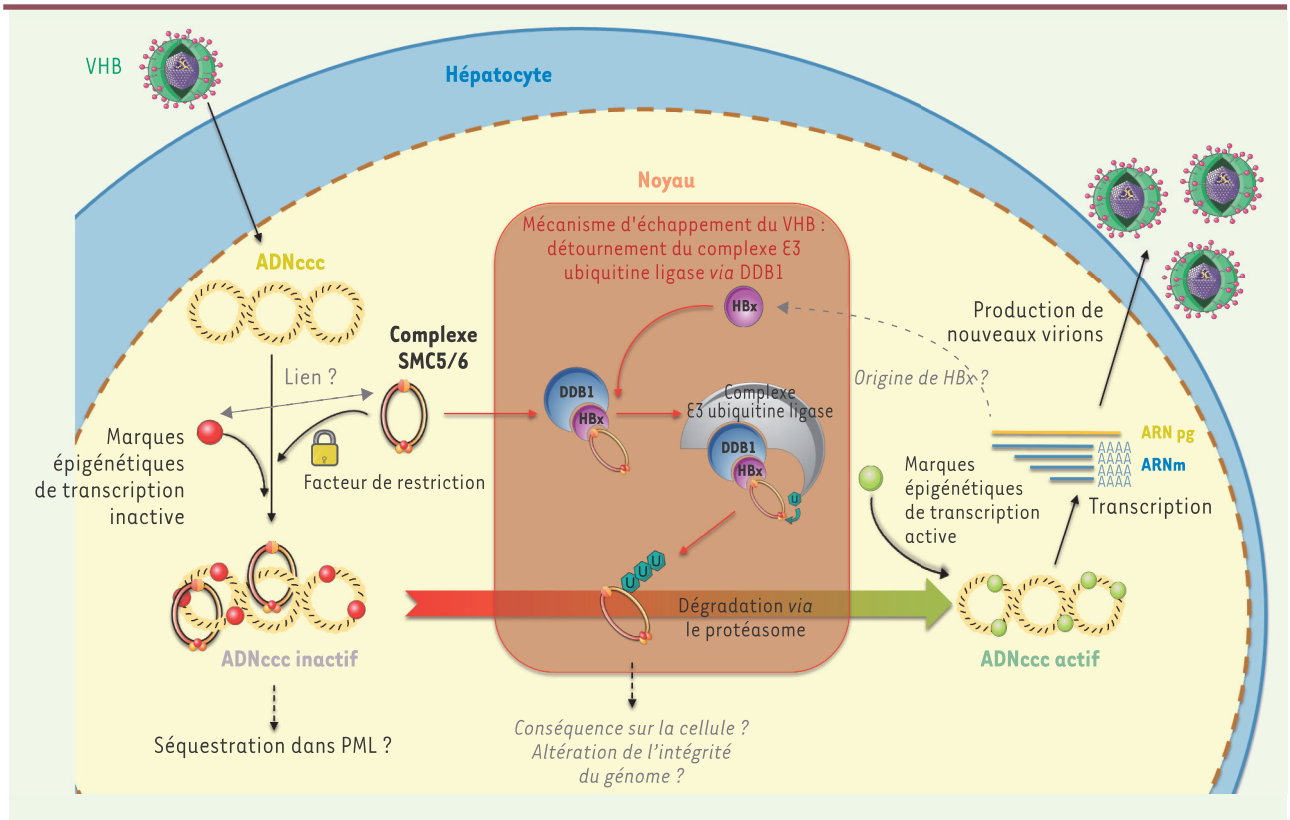


Figure 2. HBx détourne le complexe E3 ubiquitine ligase pour dégrader le facteur de restriction SMC5/6. Lors d'une infection par le virus de l'hépatite B (VHB), l'ADNccc (pour circulaire clos de façon covalente) est reconnu par le facteur de restriction SMC5/6 (*structural maintenance of chromosomes proteins 5/6*) et subit des modifications épigénétiques conduisant à l'inhibition de la transcription de l'ADN. Le VHB a mis en place un mécanisme d'échappement pour lutter contre ce phénomène. Pour cela, la protéine virale HBx (protéine X du VHB), par le biais de son interaction avec DDB1(*DNA damage-binding protein 1*), recrute le complexe SMC5/6 au sein du complexe E3 ubiquitine ligase pour permettre l'ubiquitination et la dégradation de SMC5/6. Ainsi, l'ADNccc n'est plus inhibé (on observe des marques épigénétiques de transcription active), la transcription des ARN viraux et de l'ARN pré-génomique (ARN pg) est possible et permet la sécrétion de nouveaux virions. En gris apparaissent les points qui restent à éclaircir à la suite de notre étude, à savoir : quel est le lien entre le complexe SMC5/6 et la présence des modifications épigénétiques sur l'ADNccc ? La liaison entre ADN viral et SMC5/6 engendre-t-elle la séquestration de l'ADNccc dans des corps nucléaires PML (*promyelocytic leukaemia nuclear bodies*) ? Quelle est l'origine de HBx ? Vient-il de la particule virale ou la transcription du gène *x* échappe-t-elle à l'inhibition ? Et, enfin, quelles sont les conséquences de la dégradation de SMC5/6 sur la survie et l'intégrité des cellules ? U : ubiquitine.

chromatine associés et leurs impacts sur le DDR pourraient permettre une meilleure compréhension de l'activité pro-oncogénique de HBx et de la transformation cellulaire engendrée par le virus de l'hépatite B. Ceci pourrait ouvrir, à terme, une nouvelle voie de traitement pour les CHC avec une telle étiologie. ◊

A new restriction factor against HBV infection: the SMC5/6 complex

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

NOTE AJOUTÉE AUX ÉPREUVES

Des résultats publiés très récemment confirment nos observations et l'importance de la dégradation du complexe SMC5/6 par HBx pour la réplication du VHB [14].

RÉFÉRENCES

1. Buendia MA, Neuveut C. Hepatocellular carcinoma. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015; 5 : a021444.
2. Revill P, Testoni B, Locarnini S, Zoulim F. Global strategies are required to cure and eliminate HBV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016 ; 13 : 239-48.
3. Benhenda S, Cougot D, Buendia MA, Neuveut C. Hepatitis B virus X protein molecular functions and its role in virus life cycle and pathogenesis. *Adv Cancer Res* 2009 ; 103 : 75-109.
4. Rivière L, Gérossier L, Hantz O, Neuveut C. Virus de l'hépatite B et chromatine - Une protéine virale, HBx, interfère avec la machinerie épigénétique de la cellule. *Med Sci (Paris)* 2016 ; 32 : 455-8.
5. Li T, Robert EI, van Breugel PC, *et al.* A promiscuous alpha-helical motif anchors viral hijackers and substrate receptors to the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase machinery. *Nat Struct Mol Biol* 2010 ; 17 : 105-11.
6. Iovine B, Iannella ML, Bevilacqua MA. Damage-specific DNA binding protein 1 (DDB1): a protein with a wide range of functions. *Int J Biochem Cell Biol* 2011 ; 43 : 1664-7.
7. Decorsiere A, Mueller H, van Breugel PC, *et al.* Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor. *Nature* 2016 ; 531 : 386-9.

RÉFÉRENCES

8. van Breugel PC, Robert EI, Mueller H, *et al.* Hepatitis B virus X protein stimulates gene expression selectively from extrachromosomal DNA templates. *Hepatology* 2012 ; 56 : 2116-24.
9. Maarifi G, Dianoux L, Nisole S, Chelbi-Alix MK. Les paralogues de SUMO et la réponse interféron. *Med Sci (Paris)* 2016 ; 32 : 141-3.
10. Lahouassa H, Dragin L, Transy C, Margottin-Goguet F. SAMHD1 prive le VIH des nucléotides essentiels à la synthèse d'ADN viral. *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 909-10.
11. Calistri A, Munegato D, Carli I, *et al.* The ubiquitin-conjugating system: multiple roles in viral replication and infection. *Cells* 2014 ; 3 : 386-417.
12. Potts PR. The Yin and Yang of the MMS21-SMC5/6 SUMO ligase complex in homologous recombination. *DNA repair* 2009 ; 8 : 499-506.
13. Lukas J, Lukas C, Bartek J. More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nat Cell Biol* 2011 ; 13 : 1161-9.
14. Murphy CM, Xu Y2, Li F1, *et al.* Hepatitis B virus X protein promotes degradation of SMC5/6 to enhance HBV replication. *Cell Rep* 2016 ; 16 : 2846-54.

NOUVELLE

Un modèle murin pour une infection chronique méconnue : l'hépatite E !

Hélène Gilgenkrantz[1], Jérôme Gouttenoire[2], Vincent Mallet[3]

[1] Institut Cochin, Inserm U1016, CNRS UMR 8104, Université Paris-Descartes, 24, rue du faubourg saint-Jacques, 75005 Paris, France ; [2] Division de gastro-entérologie et d'hépatologie, centre hospitalier universitaire vaudois, université de Lausanne, Suisse ; [3] Université Paris Descartes, assistance publique-hôpitaux de Paris, groupe hospitalier Cochin Port Royal, service d'hépatologie, Inserm U1223, Institut Pasteur, Paris, France.
helene.gilgenkrantz@inserm.fr

Un virus oublié, une maladie émergente…

L'hépatite E est reconnue comme la première cause d'hépatite à transmission entérique dans le monde [1] (➜). Si la première épidémie a été décrite dans les années 1950 en Inde, le virus n'a été identifié qu'en 1983 par un chercheur soviétique, Mikhail Balayan, et le génome cloné quelques années plus tard, en 1990. Cette infection oubliée ne fait pourtant parler à nouveau d'elle que depuis quelques années dans les meilleurs journaux scientifiques, notamment depuis que l'on connaît sa prévalence en France et sa gravité chez les individus fragiles.

(➜) Voir la Nouvelle de J. Izopet et N. Kamar, *m/s* n° 12, décembre 2008, page 1023

Le virus de l'hépatite E (VHE) appartient à la famille *Herpesviridae*. C'est un petit virus non enveloppé qui possède un génome à ARN simple brin à polarité positive, comportant 3 phases ouvertes de lecture (ORF, *open reading frame*) qui conduisent à la traduction de seulement 3 protéines virales : ORF1, 2 et 3.

Grâce à l'avènement des puissantes techniques de séquençage à haut-rendement, le VHE a pu être identifié dans de nombreuses espèces animales. La diversité d'animaux susceptibles d'être infectés par ce virus constitue un réservoir potentiel de transmission zoonotique à l'homme. Actuellement, on connaît quatre génotypes majeurs : les VHE1 et 2 sont restreints à l'homme et sont endémiques dans les régions en voie de développement, alors que les VHE3 et 4 peuvent également infecter certains mammifères et sont surtout présents dans les pays industrialisés. En France, le génotype VHE3 est particulièrement représenté avec une nette prévalence dans le sud toulousain, sans que la raison en soit actuellement comprise. L'origine de la majorité des infections serait essentiellement l'ingestion d'eau contaminée dans les régions endémiques et la consommation de viande (porc, gibier) insuffisamment cuite dans les pays industrialisés. De nouveaux modes de contamination ne cessent néanmoins d'être rapportés. La transfusion sanguine par exemple, effectuée en général chez des individus fragiles, est un mode de transmission qui a été récemment mis en exergue dans plusieurs publications [2]. Un vaccin très efficace a été développé à partir de la protéine recombinante de la capside virale mais son utilisation et sa commercialisation restent cependant restreintes à l'Asie.

Dans la majorité des cas, l'infection par le VHE est asymptomatique et spontanément résolutive. Cependant, l'infection par VHE1, chez la femme enceinte, peut avoir des conséquences dramatiques, avec un taux de mortalité atteignant 25 %. C'est en 2008 que le VHE fait son entrée parmi les causes de cirrhose, au même titre que les hépatites B et C [3]. Cependant, la persistance du virus, définie par une virémie enregistrée au-delà de 6 mois, n'est observée qu'en cas d'immunosuppression, notamment chez des patients traités par chimiothérapie, ou infectés par le VIH (virus de l'immunodéficience humaine) présentant de faibles taux de lymphocytes CD4 ou, plus couramment, chez les patients transplantés d'organes (rein, cœur, poumon, foie). L'histoire naturelle de l'hépatite chronique E se caractérise par une progression rapide vers la cirrhose et ses complications, et ce de façon beaucoup plus rapide qu'au cours des hépatites chroniques B et C. Les personnes âgées, ou avec une maladie du foie sous-jacente, sont à risque d'insuffisance hépatite sévère. Des atteintes extrahépatiques, dont le mécanisme sous-jacent n'est pour l'instant pas compris, sont également rapportées.

DOI : 10.1051/medsci/20163210007

Clinical, Histological, and Molecular Data of HCC in the French Cohort (178 patients with tumoral tissues including 146 patients with non tumoral related liver)

Variable	Measurement
Sex, no. (%)	
Male	144/178 (81)
Female	34/178 (19)
Median age, y(range)	63 (35-84)
Etiology, no. (%)	
HCV	53 (30)
HBV	41 (23)
Alcohol	52 (29)
NASH	32 (18)
Tumor size,Largest diameter (mm); mean (range)	65 (15-220)
Tumor numbers, no. (%)	
1	132 (75)
2	36 (20)
>2	10 (5)
Differentiation (WHO), n=123. (%)	
Well	75 (42)
Moderate	78 (44)
poor	25 (14)
BCLC-stage, no. (%)	
0	16 (9)
A	125 (70)
B	37 (21)
Child-Pugh score, no. (%)	
A	160 (90)
B	18 (10)
Severe fibrosis (F3) or cirrhosis(F4) no. (%)	
Yes	105 (59)
Non	73 (41)
Preoperative median α-fetoprotein, ng/mL (range)	10 (2-1000000)
Median survival, months (25th to 75th percentile)	33 (18-57)

Bibliographie

1. Schweitzer, A., et al., *Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013.* The Lancet. **386**(10003): p. 1546-1555.
2. Shepard, C.W., et al., *Hepatitis B Virus Infection: Epidemiology and Vaccination.* Epidemiologic Reviews, 2006. **28**(1): p. 112-125.
3. Ott, J.J., et al., *Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity.* Vaccine, 2012. **30**(12): p. 2212-9.
4. Hyams, K.C., *Risks of chronicity following acute hepatitis B virus infection : a review.* Clin.Infect.Dis., 1995. **20**(4): p. 992-1000.
5. Beasley, R.P., *Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma.* Cancer, 1988. **61**(10): p. 1942-1956.
6. Brechot, C., et al., *Hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC): Molecular mechanisms and novel paradigms.* Pathologie Biologie, 2010. **58**(4): p. 278-287.
7. Isorce, N., *Du criblage de l'activité antivirale de divers interférons et cytokines pro-inflammatoires contre HBV, vers la description du mécanisme antiviral de l'interleukine-1ß dépendant de NF-κB*. 2015.
8. Raimondo, G., et al., *Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection.* J Hepatol, 2008. **49**(4): p. 652-7.
9. Deny, P. and F. Zoulim, *Hepatitis B virus: from diagnosis to treatment.* Pathol Biol (Paris), 2010. **58**(4): p. 245-53.
10. Zoulim, F. and D. Durantel, *Antiviral Therapies and Prospects for a Cure of Chronic Hepatitis B.* Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2015. **5**(4): p. a021501.
11. Werle-Lapostolle, B., et al., *Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy.* Gastroenterology, 2004. **126**(7): p. 1750-8.
12. Lucifora, J., et al., *Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA.* Science, 2014. **343**(6176): p. 1221-8.
13. Michel, M.-L., *Vaccination contre l'hépatite B.* Med Sci (Paris), 2016. **32**(8-9): p. 739-745.
14. Rasche, A., B.F.d.C.D. Souza, and J.F. Drexler, *Bat hepadnaviruses and the origins of primate hepatitis B viruses.* Current Opinion in Virology, 2016. **16**: p. 86-94.
15. Seeger, C. and W.S. Mason, *Molecular Biology of Hepatitis B Virus Infection.* Virology, 2015. **0**: p. 672-686.
16. Tong, S. and P. Revill, *Overview of viral replication and genetic variability.* Journal of hepatology, 2016. **64**(1 Suppl): p. S4-S16.
17. Summers, J., A. O'Connell, and I. Millman, *Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1975. **72**: p. 4597-4601.
18. Beck, J. and M. Nassal, *Hepatitis B virus replication.* World Journal of Gastroenterology : WJG, 2007. **13**(1): p. 48-64.

19. Alfaiate, D., P. Dény, and D. Durantel, *Hepatitis delta virus: From biological and medical aspects to current and investigational therapeutic options.* Antiviral Research, 2015. **122**: p. 112-129.
20. Schmitt, S., et al., *Structure of pre-S2 N- and O-linked glycans in surface proteins from different genotypes of hepatitis B virus.* Journal of General Virology, 2004. **85**(7): p. 2045-2053.
21. Persing, D.H., H.E. Varmus, and D. Ganem, *The preS1 protein of hepatitis B virus is acylated at its amino terminus with myristic acid.* Journal of Virology, 1987. **61**(5): p. 1672-1677.
22. Gripon, P., I. Cannie, and S. Urban, *Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein.* J Virol, 2005. **79**(3): p. 1613-22.
23. Yan, H., et al., *Viral entry of hepatitis B and D viruses and bile salts transportation share common molecular determinants on sodium taurocholate cotransporting polypeptide.* J Virol, 2014. **88**(6): p. 3273-84.
24. Trépo, C., P. Merle, and F. Zoulim, *Les hépatites virales B et C*. 2006: John Libbey Eurotext.
25. Kann, M., A. Schmitz, and B. Rabe, *Intracellular transport of hepatitis B virus.* World Journal of Gastroenterology : WJG, 2007. **13**(1): p. 39-47.
26. Schödel, F., et al., *Structure of hepatitis B virus core and e-antigen. A single precore amino acid prevents nucleocapsid assembly.* Journal of Biological Chemistry, 1993. **268**(2): p. 1332-1337.
27. Steven, A.C., et al., *Structure, Assembly, and Antigenicity of Hepatitis B Virus Capsid Proteins*, in *Advances in Virus Research*. 2005, Academic Press. p. 125-164.
28. Weber, M., et al., *Hepadnavirus P protein utilizes a tyrosine residue in the TP domain to prime reverse transcription.* Journal of Virology, 1994. **68**(5): p. 2994-2999.
29. Shin, Y.-C., C. Ko, and W.-S. Ryu, *Hydrophobic residues of terminal protein domain of hepatitis B virus polymerase contribute to distinct steps in viral genome replication.* FEBS Letters, 2011. **585**(24): p. 3964-3968.
30. Nassal, M., *Hepatitis B viruses: Reverse transcription a different way.* Virus Research, 2008. **134**(1–2): p. 235-249.
31. Wei, X. and D.L. Peterson, *Expression, purification, and characterization of an active RNase H domain of the hepatitis B viral polymerase.* (0021-9258 (Print)).
32. Zoulim, F. and S. Locarnini, *Hepatitis B Virus Resistance to Nucleos(t)ide Analogues.* Gastroenterology, 2009. **137**(5): p. 1593-1608.e2.
33. Soussan, P., et al., *In vivo expression of a new hepatitis B virus protein encoded by a spliced RNA.* J Clin Invest, 2000. **105**(1): p. 55-60.
34. Soussan, P., et al., *The expression of hepatitis B spliced protein (HBSP) encoded by a spliced hepatitis B virus RNA is associated with viral replication and liver fibrosis.* Journal of Hepatology, 2003. **38**(3): p. 343-348.
35. Pol, J.G., et al., *Alternative splicing-regulated protein of hepatitis B virus hacks the TNF-α-stimulated signaling pathways and limits the extent of liver inflammation.* The FASEB Journal, 2015. **29**(5): p. 1879-1889.
36. Assrir, N., et al., *Role of the Hepatitis B virus proteins in pro- and anti-apoptotic processes.* Front Biosci (Landmark Ed), 2010. **15**: p. 12-24.
37. Dane, D.S., C.H. Cameron, and M. Briggs, *Virus-like particles in serum of patients with Australia antigen associated hepatitis.* Lancet, 1970. **2**: p. 695-698.

38. Hu, J. and K. Liu, *Complete and Incomplete Hepatitis B Virus Particles: Formation, Function, and Application.* Viruses, 2017. **9**(3): p. 56.
39. Wang, J., et al., *Serum hepatitis B virus RNA is encapsidated pregenome RNA that may be associated with persistence of viral infection and rebound.* Journal of Hepatology. **65**(4): p. 700-710.
40. Urban, S., et al., *Strategies to Inhibit Entry of HBV and HDV Into Hepatocytes.* Gastroenterology, 2014.
41. Zoulim, F. and S. Locarnini, *Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues.* Gastroenterology, 2009. **137**(5): p. 1593-608 e1-2.
42. Sureau, C. and J. Salisse, *A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus A-determinant.* Hepatology, 2013. **57**(3): p. 985-994.
43. Schulze, A., P. Gripon, and S. Urban, *Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein–dependent binding to heparan sulfate proteoglycans.* Hepatology, 2007. **46**(6): p. 1759-1768.
44. Yan, H., et al., *Molecular determinants of hepatitis B and D virus entry restriction in mouse sodium taurocholate cotransporting polypeptide.* J Virol, 2013. **87**(14): p. 7977-91.
45. Bock, C.T., et al., *Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome.* J Mol Biol, 2001. **307**(1): p. 183-96.
46. Summers, J., P.M. Smith, and A.L. Horwich, *Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification.* Journal of Virology, 1990. **64**(6): p. 2819-2824.
47. Summers, J., et al., *Hepatocyte turnover during resolution of a transient hepadnaviral infection.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(20): p. 11652-9.
48. Wang, J., et al., *Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma.* Nature, 1990. **343**: p. 555-557.
49. Lewin, S., T. Walters, and S. Locarnini, *Hepatitis B treatment: rational combination chemotherapy based on viral kinetic and animal model studies.* Antiviral Research, 2002. **55**(3): p. 381-396.
50. Allweiss, L. and M. Dandri, *Experimental in vitro and in vivo models for the study of human hepatitis B virus infection.* Journal of Hepatology, 2016. **64**(1, Supplement): p. S17-S31.
51. Kock, J., et al., *Inhibitory effect of adefovir and lamivudine on the initiation of hepatitis B virus infection in primary tupaia hepatocytes.* Hepatology, 2003. **38**(6): p. 1410-8.
52. Levrero, M., et al., *Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection.* J Hepatol, 2009. **51**(3): p. 581-92.
53. Bock, C.T., et al., *Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell.* Virus Genes, 1994. **8**(3): p. 215-229.
54. Newbold, J., et al., *The covalently closed duplex form of the Hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes.* J Virol, 1995. **69**: p. 3350-3357.
55. Pollicino, T., et al., *Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones.* Gastroenterology, 2006. **130**(3): p. 823-37.

56. Moolla, N., M. Kew, and P. Arbuthnot, *Regulatory elements of hepatitis B virus transcription.* J Viral Hepat, 2002. **9**(5): p. 323-31.
57. Zhang, Y., et al., *Transcription of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA Is Regulated by CpG Methylation during Chronic Infection.* PLoS ONE, 2014. **9**(10): p. e110442.
58. Tropberger, P., et al., *Mapping of histone modifications in episomal HBV cccDNA uncovers an unusual chromatin organization amenable to epigenetic manipulation.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015. **112**(42): p. E5715-E5724.
59. Zoulim, F., B. Testoni, and F. Lebossé, *Kinetics of Intrahepatic Covalently Closed Circular DNA and Serum Hepatitis B Surface Antigen During Antiviral Therapy for Chronic Hepatitis B: Lessons From Experimental and Clinical Studies.* Clinical Gastroenterology and Hepatology, 2013. **11**(8): p. 1011-1013.
60. Zhang, X., J. Hou, and M. Lu, *Regulation of hepatitis B virus replication by epigenetic mechanisms and microRNAs.* Frontiers in Genetics, 2013. **4**: p. 202.
61. Guo, Y.H., et al., *HBc binds to the CpG islands of HBV cccDNA and promotes an epigenetic permissive state.* Epigenetics, 2011. **6**(6): p. 720-6.
62. Belloni, L., et al., *Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(47): p. 19975-9.
63. Protzer, U., *Viral hepatitis: The bumpy road to animal models for HBV infection.* Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017. **advance online publication**.
64. Dupinay, T., et al., *Discovery of naturally occurring transmissible chronic hepatitis B virus infection among Macaca fascicularis from Mauritius Island.* Hepatology, 2013. **58**(5): p. 1610-20.
65. Walter, E., et al., *Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo.* Hepatology, 1996. **24**: p. 1-5.
66. Mason, W.S., et al., *Asymetric replication of duck hepatitis B virus DNA in liver cells : free minus strand DNA.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1982. **79**: p. 3997-4001.
67. Summers, J. and W.S. Mason, *Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate.* Cell, 1982. **29**: p. 403-415.
68. Guidotti, L.G., et al., *High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice.* J Virol, 1995. **69**(10): p. 6158-6169.
69. Dion, S., et al., *Adeno-associated virus-mediated gene transfer leads to persistent hepatitis B virus replication in mice expressing HLA-A2 and HLA-DR1 molecules.* J Virol, 2013. **87**(10): p. 5554-63.
70. Dandri, M. and J. Petersen, *Chimeric mouse model of hepatitis B virus infection.* Journal of Hepatology, 2012. **56**(2): p. 493-495.
71. Yan, Z., et al., *HBVcircle: A novel tool to investigate hepatitis B virus covalently closed circular DNA.* Journal of Hepatology.
72. Lempp, F.A., et al., *Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is the limiting host factor of Hepatitis B Virus infection in macaque and pig hepatocytes.* Hepatology, 2017: p. n/a-n/a.
73. Sells, M.A., M. Chen, and G. Acs, *Production of hepatitis B virus particles in hepG2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987. **84**: p. 1005-1009.

74. Ladner, S.K., et al., *Inducible expression of human hepatitis B virus (HBV) instably transfected hepatoblastoma cells : a novel system for screening potential inhibitors of HBV replication.* Antimicrob. Agents Chemother., 1997. **41**: p. 1715-1720.
75. Glebe, D., et al., *Optimised Conditions for the Production of Hepatitis B Virus from Cell Culture.* Intervirology, 2001. **44**(6): p. 370-378.
76. Lucifora, J., et al., *Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection.* J Hepatol, 2011. **55**(5): p. 996-1003.
77. van Breugel, P.C., et al., *Hepatitis B virus X protein stimulates gene expression selectively from extrachromosomal DNA templates.* Hepatology, 2012. **56**(6): p. 2116-24.
78. Yan, H., et al., *Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus.* eLife, 2012. **1**: p. e00049.
79. Gripon, P., et al., *Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide.* j. Virol., 1988. **62**: p. 4136-4143.
80. Galle, P.R., et al., *In Vitro Experimental Infection of Primary Human Hepatocytes with Hepatitis B Virus.* Gastroenterology, 1994. **106**(3): p. 664-673.
81. Shlomai, A., et al., *Modeling host interactions with hepatitis B virus using primary and induced pluripotent stem cell-derived hepatocellular systems.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2014.
82. Godoy, P., et al., *Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME.* Archives of Toxicology, 2013. **87**(8): p. 1315-1530.
83. Fourel, I., et al., *Prolonged duck hepatitis B virus replication in duck hepatocytes cocultivated with rat epithelial cells : a useful system for antiviral testing.* Hepatology, 1989. **10**: p. 186-191.
84. March, S., et al., *Micropatterned coculture of primary human hepatocytes and supportive cells for the study of hepatotropic pathogens.* Nat. Protocols, 2015. **10**(12): p. 2027-2053.
85. Gripon, P., et al., *Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15655-60.
86. Hantz, O., et al., *Persistence of the hepatitis B virus covalently closed circular DNA in HepaRG human hepatocyte-like cells.* J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 1): p. 127-35.
87. Sureau, C., et al., *Production of Hepatitis B Virus by a differentiated human hepatoma cell line after transfection with cloned circular HBV DNA.* Cell, 1986. **47**: p. 37-47.
88. Sells, M.A., et al., *Replicative Intermediates of Hepatitis B Virus in HepG2 Cells That Produce Infectious Virions.* J Virol, 1988. **62**: p. 2836-2844.
89. Tsurimoto, T., A. Fujiyama, and K. Matsubara, *Stable expression and replication of hepatitis B virus genome in a integrated state in a human hepatoma cell line transfected with the the cloned viral DNA.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987. **84**: p. 444-448.
90. Yaginuma, K., et al., *Hepatitis B Virus Particles are Produced in a cell Culture System by Transient Expression of Transfected HBV DNA.* Proc. Natl. Acad. Sci., 1987. **84**: p. 2678-2682.
91. Lucifora, J., et al., *Initiation of hepatitis B virus genome replication and production of infectious virus following delivery in HepG2 cells by novel recombinant baculovirus vector.* J Gen Virol, 2008. **89**(Pt 8): p. 1819-28.

92. Ko, C., et al., *DDX3 DEAD-Box RNA Helicase Is a Host Factor That Restricts Hepatitis B Virus Replication at the Transcriptional Level.* Journal of Virology, 2014. **88**(23): p. 13689-13698.
93. Nkongolo, S., et al., *Cyclosporin A inhibits hepatitis B and hepatitis D virus entry by cyclophilin-independent interference with the NTCP receptor.* J Hepatol, 2014. **60**(4): p. 723-31.
94. Levrero, M. and J. Zucman-Rossi, *Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma.* Journal of Hepatology, 2016. **64**(1, Supplement): p. S84-S101.
95. Bergametti, F., J. Bianchi, and C. Transy, *Interaction of hepatitis B virus X protein with damaged DNA-binding protein p127: structural analysis and identification of antagonists.* J Biomed Sci, 2002. **9**(6 Pt 2): p. 706-15.
96. Minor, M.M. and B.L. Slagle, *Hepatitis B Virus HBx Protein Interactions with the Ubiquitin Proteasome System.* Viruses, 2014. **6**(11): p. 4683-4702.
97. Benhenda, S., et al., *Hepatitis B virus X protein molecular functions and its role in virus life cycle and pathogenesis.* Adv Cancer Res, 2009. **103**: p. 75-109.
98. Li, T., et al., *A promiscuous alpha-helical motif anchors viral hijackers and substrate receptors to the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase machinery.* Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(1): p. 105-11.
99. Bergametti, F., D. Sitterlin, and C. Transy, *Turnover of hepatitis B virus X protein is regulated by damaged DNA-binding complex.* J Virol, 2002. **76**(13): p. 6495-501.
100. Zoulim, F., J. Saputelli, and C. Seeger, *Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo.* J Virol, 1994. **68**(3): p. 2026-30.
101. Keasler, V.V., et al., *Enhancement of Hepatitis B Virus Replication by the Regulatory X Protein In Vitro and In Vivo.* Journal of Virology, 2007. **81**(6): p. 2656-2662.
102. Keasler, V.V., et al., *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, 2009. **390**(1): p. 122-129.
103. Twu, J.S. and R.H. Schloemer, *Transcriptional trans-activating function of hepatitis B virus.* J.Virol., 1987. **61**: p. 3448-3453.
104. Tang, H., et al., *The Transcriptional Transactivation Function of HBx Protein Is Important for Its Augmentation Role in Hepatitis B Virus Replication.* Journal of Virology, 2005. **79**(9): p. 5548-5556.
105. Thumann-Schweitzer, C., et al., *Anti-human immunodeficiency virus type 1 activities of dideoxynucleoside phosphotriester derivatives in primary monocytes/macrophages.* Res Virol, 1996. **147**(2-3): p. 155-63.
106. Wei, Y., et al., *Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene.* Pathologie Biologie, 2010. **58**(4): p. 267-272.
107. Barnabas, S. and O.M. Andrisani, *Different regions of hepatitis B virus X protein are required for enhancement of bZip-mediated transactivation versus transrepression.* J Virol, 2000. **74**(1): p. 83-90.
108. Cougot, D., et al., *The hepatitis B virus X protein functionally interacts with CREB-binding protein/p300 in the regulation of CREB-mediated transcription.* J Biol Chem, 2007. **282**(7): p. 4277-87.
109. McClain, S.L., et al., *Hepatitis B Virus Replication Is Associated with an HBx-Dependent Mitochondrion-Regulated Increase in Cytosolic Calcium Levels.* Journal of Virology, 2007. **81**(21): p. 12061-12065.

110. Rahmani, Z., et al., *Hepatitis B virus X protein colocalizes to mitochondria with a human voltage-dependent anion channel, HVDAC3, and alters its transmembrane potential.* j virol, 2000. **74**
http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=20148977(6): p. 2840-6.
111. Bouchard, M., et al., *Hepatitis B Virus HBx Protein Activation of Cyclin A-Cyclin-Dependent Kinase 2 Complexes and G1 Transit via a Src Kinase Pathway.* J. Virol., 2001. **75**(9): p. 4247-4257.
112. Klein, N.P., et al., *Src kinases involved in hepatitis B virus replication.* Embo J, 1999. **18**(18): p. 5019-27.
113. Bouchard, M.J., et al., *Activation and Inhibition of Cellular Calcium and Tyrosine Kinase Signaling Pathways Identify Targets of the HBx Protein Involved in Hepatitis B Virus Replication.* The Journal of Virology
J. Virol., 2003. **77**(14): p. 7713.
114. Melegari, M., S.K. Wolf, and R.J. Schneider, *Hepatitis B Virus DNA Replication Is Coordinated by Core Protein Serine Phosphorylation and HBx Expression.* Journal of Virology, 2005. **79**(15): p. 9810-9820.
115. Gearhart, T.L. and M.J. Bouchard, *The Hepatitis B Virus X Protein Modulates Hepatocyte Proliferation Pathways To Stimulate Viral Replication.* Journal of Virology, 2010. **84**(6): p. 2675-2686.
116. Gearhart, T.L. and M.J. Bouchard, *The Hepatitis B Virus HBx Protein Modulates Cell Cycle Regulatory Proteins in Cultured Primary Human Hepatocytes.* Virus research, 2011. **155**(1): p. 363-367.
117. Luo, L., et al., *Hepatitis B virus X protein modulates remodelling of minichromosomes related to hepatitis B virus replication in HepG2 cells.* Int J Mol Med, 2013. **31**(1): p. 197-204.
118. Wei, X., et al., *miR-101 is down-regulated by the hepatitis B virus x protein and induces aberrant DNA methylation by targeting DNA methyltransferase 3A.* Cell Signal, 2013. **25**(2): p. 439-46.
119. Cougot, D., et al., *Inhibition of PP1 Phosphatase Activity by HBx: A Mechanism for the Activation of Hepatitis B Virus Transcription.* Sci Signal, 2012. **5**(205): p. ra1.
120. Benhenda, S., et al., *Methyltransferase PRMT1 is a binding partner of HBx and a negative regulator of hepatitis B virus transcription.* J Virol, 2013. **87**(8): p. 4360-71.
121. Ducroux, A., et al., *The Tudor Domain Protein Spindlin1 Is Involved in Intrinsic Antiviral Defense against Incoming Hepatitis B Virus and Herpes Simplex Virus Type 1.* PLoS Pathog, 2014. **10**(9): p. e1004343.
122. Leupin, O., S. Bontron, and M. Strubin, *Hepatitis B virus X protein and simian virus 5[thinsp]V protein exhibit similar UV-DDB1 binding properties to mediate distinct activities.* J. Virol., 2003. **77**: p. 6274-6283.
123. Sitterlin, D., et al., *Interaction of the UV-damaged DNA-binding protein with hepatitis B virus X protein is conserved among mammalian hepadnaviruses and restricted to transactivation-proficient X-insertion mutants.* J Virol, 1997. **71**(8): p. 6194-6199.
124. Sitterlin, D., F. Bergametti, and C. Transy, *UVDDB p127-binding modulates activities and intracellular distribution of hepatitis B virus X protein [In Process Citation].* Oncogene, 2000. **19**(38): p. 4417-26.
125. Leupin, O., et al., *Hepatitis B virus X protein stimulates viral genome replication via a DDB1-dependent pathway distinct from that leading to cell death.* J Virol, 2005. **79**(7): p. 4238-45.

126. Lin-Marq, N., et al., *Hepatitis B virus X protein interferes with cell viability through interaction with the p127-kDa UV-damaged DNA-binding protein.* Virology, 2001. **287**(2): p. 266-274.
127. Bontron, S., N. Lin-Marq, and M. Strubin, *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, 2002. **277**(41): p. 38847-54.
128. Sitterlin, D., et al., *Correct binding of viral X protein to UVDDB-p127 cellular protein is critical for efficient infection by hepatitis B viruses.* Oncogene, 2000. **19**(38): p. 4427-31.
129. Ferlay J, S.I., Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F., *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet].* 2013.
130. Bray F, R.J., Masuyer E, Ferlay J. Estimates *Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008.* Int J Cancer, 2012. **Mar 1**(132(5)): p. 1133-45.
131. Gomaa, A.I., et al., *Hepatocellular carcinoma: Epidemiology, risk factors and pathogenesis.* World J Gastroenterol, 2008. **14**(27): p. 4300-4308.
132. Flores, A. and J.A. Marrero, *Emerging Trends in Hepatocellular Carcinoma: Focus on Diagnosis and Therapeutics.* Clinical Medicine Insights. Oncology, 2014. **8**: p. 71-76.
133. Wynn, T.A., *Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases.* J Clin Invest, 2007. **117**(3): p. 524-9.
134. Wynn, T.A., *Cellular and molecular mechanisms of fibrosis.* J Pathol, 2008. **214**(2): p. 199-210.
135. Simonetti, R.G., et al., *Hepatocellular carcinoma. A worldwide problem and the major risk factors.* Dig Dis Sci, 1991. **36**(8): p. 1122-9.
136. Kew, M., *Hepatocellular carcinoma with and without cirrhosis. A comparison in southern African blacks.* Gastroenterologie, 1989. **97**(1): p. 136-9.
137. Fattovich G, et al., *Hepatocellular Carcinoma in Cirrhosis: Incidence and Risk Factors.* Gastroenterology, 2004. **127**: p. S35-S50.
138. Montalto, G., et al., *Epidemiology, Risk Factors, and Natural History of Hepatocellular Carcinoma.* Ann N Y Acad Sci, 2002. **963**: p. 13-20.
139. El-Refaie, A., et al., *HCV-associated hepatocellular carcinoma without cirrhosis.* Journal of Hepatology, 1996. **24**(3): p. 277-285.
140. Bartenschlager, R., V. Lohmann, and F. Penin, *The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection.* Nat Rev Micro, 2013. **11**(7): p. 482-496.
141. Perz, J.F., et al., *The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide.* Journal of Hepatology, 2006. **45**(4): p. 529-538.
142. Freeman, A.J., et al., *Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection.* Hepatology, 2001. **34**(4): p. 809-816.
143. El-Serag, H.B., *Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma.* Gastroenterology, 2012. **142**(6): p. 1264-1273 e1.
144. Chang, M.-H., et al., *Universal Hepatitis B Vaccination in Taiwan and the Incidence of Hepatocellular Carcinoma in Children.* New England Journal of Medicine, 1997. **336**(26): p. 1855-1859.

145. Foster, P.L., E. Eisenstadt, and J.H. Miller, *Base substitution mutations induced by metabolically activated aflatoxin B1.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1983. **80**(9): p. 2695-2698.
146. Bressac, B., et al., *Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa.* Nature, 1991. **350**(6317): p. 429-431.
147. Turner, P.C., et al., *The role of aflatoxins and hepatitis viruses in the etiopathogenesis of hepatocellular carcinoma: A basis for primary prevention in Guinea–Conakry, West Africa.* Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2002. **17**: p. S441-S448.
148. Qian, G.S., et al., *A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China.* Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 1994. **3**(1): p. 3.
149. McCoy, G.D., et al., *Differential Effect of Chronic Ethanol Consumption on the Carcinogenicity of N-Nitrosopyrrolidine and N′ -Nitrosonornicotine in Male Syrian Golden Hamsters.* Cancer Research, 1981. **41**(7): p. 2849.
150. McGlynn, K.A. and W.T. London, *Epidemiology and natural history of hepatocellular carcinoma.* Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 2005. **19**(1): p. 3-23.
151. Davila, J.A., et al., *Diabetes increases the risk of hepatocellular carcinoma in the United States: a population based case control study.* Gut, 2005. **54**(4): p. 533-539.
152. Desbois, A.-C. and P. Cacoub, *Diabetes mellitus, insulin resistance and hepatitis C virus infection: A contemporary review.* World Journal of Gastroenterology, 2017. **23**(9): p. 1697-1711.
153. Blais, P., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease is underrecognized in the primary care setting.* Am J Gastroenterol, 2015. **110**(1): p. 10-4.
154. Piscaglia, F., et al., *Clinical patterns of hepatocellular carcinoma in nonalcoholic fatty liver disease: A multicenter prospective study.* Hepatology, 2016. **63**(3): p. 827-838.
155. Bellentani, S., *The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease.* Liver International, 2017. **37**: p. 81-84.
156. K.E., C., et al., *Risk factors for hepatocellular carcinoma in cirrhosis due to nonalcoholic fatty liver disease: A multicenter, case-control study.* World J Hepatol, 2017. **8**(9): p. 385-390.
157. Zucman-Rossi, J., et al., *Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma.* Gastroenterology, 2015. **149**(5): p. 1226-1239.e4.
158. Hanahan, D. and Robert A. Weinberg, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation.* Cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.
159. Merle, P. and C. Trepo, *Molecular mechanisms underlying hepatocellular carcinoma.* Viruses, 2009. **1**(3): p. 852-72.
160. Farazi, P.A. and R.A. DePinho, *Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment.* Nat Rev Cancer, 2006. **6**(9): p. 674-687.
161. El-Serag, H.B. and K.L. Rudolph, *Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis.* Gastroenterology, 2007. **132**(7): p. 2557-76.
162. Plentz, R.R., et al., *Telomere shortening and inactivation of cell cycle checkpoints characterize human hepatocarcinogenesis.* Hepatology, 2007. **45**(4): p. 968-976.
163. Ozen, C., et al., *Genetics and epigenetics of liver cancer.* New Biotechnology, 2013. **30**(4): p. 381-384.
164. Lachenmayer, A., et al., *Molecular approaches to treatment of hepatocellular carcinoma.* Digestive and Liver Disease, 2010. **42**: p. S264-S272.

165. Paradis, V., et al., *Replicative senescence in normal liver, chronic hepatitis C, and hepatocellular carcinomas.* Human Pathology, 2001. **32**(3): p. 327-332.
166. Stauffer, J.K., et al., *Chronic Inflammation, Immune Escape and Oncogenesis In the Liver: A Unique Neighborhood for Novel Intersections.* Hepatology (Baltimore, Md.), 2012. **56**(4): p. 1567-1574.
167. Murakami, Y., et al., *Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas.* Gut, 2005. **54**(8): p. 1162.
168. Tarn, C., et al., *Hepatitis B virus X protein differentially activates RAS-RAF-MAPK and JNK pathways in X-transforming versus non-transforming AML12 hepatocytes.* J Biol Chem, 2001. **276**(37): p. 34671-80.
169. Kremsdorf, D., et al., *Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: paradigms for viral-related human carcinogenesis.* Oncogene, 2006. **25**(27): p. 3823-3833.
170. Ueda, H., et al., *Functional inactivation but not structural mutation of p53 causes liver cancer.* Nat Genet, 1995. **9**(1): p. 41-47.
171. Erhardt, A., et al., *Hepatitis C Virus Core Protein Induces Cell Proliferation and Activates ERK, JNK, and p38 MAP Kinases Together with the MAP Kinase Phosphatase MKP-1 in a HepG2 Tet-Off Cell Line.* Virology, 2002. **292**(2): p. 272-284.
172. Majumder, M., et al., *Hepatitis C Virus NS5A Physically Associates with p53 and Regulates p21/waf1 Gene Expression in a p53-Dependent Manner.* Journal of Virology, 2001. **75**(3): p. 1401-1407.
173. Moriya, K., et al., *Oxidative Stress in the Absence of Inflammation in a Mouse Model for Hepatitis C Virus-associated Hepatocarcinogenesis.* Cancer Research, 2001. **61**(11): p. 4365.
174. Kamegaya, Y., et al., *Hepatitis C virus acts as a tumor accelerator by blocking apoptosis in a mouse model of hepatocarcinogenesis.* Hepatology, 2005. **41**(3): p. 660-667.
175. Hoek, J.B. and J.G. Pastorino, *Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury.* Alcohol, 2002. **27**(1): p. 63-68.
176. Zhang, B.-H., B.-H. Yang, and Z.-Y. Tang, *Randomized controlled trial of screening for hepatocellular carcinoma.* Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2004. **130**(7): p. 417-422.
177. European Association for the Study of the, L., R. European Organisation for, and C. Treatment of, *EASL–EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma.* Journal of Hepatology, 2012. **56**(4): p. 908-943.
178. Parikh, S. and D. Hyman, *Hepatocellular cancer: a guide for the internist.* Am J Med, 2007. **120**(3): p. 194-202.
179. Duvoux, C., et al., *Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma: A Model Including α-Fetoprotein Improves the Performance of Milan Criteria.* Gastroenterology, 2012. **143**(4): p. 986-994.e3.
180. Forner, A., J.M. Llovet, and J. Bruix, *Hepatocellular carcinoma.* The Lancet. **379**(9822): p. 1245-1255.
181. Magistri, P., et al., *The Evolving Role of Local Treatments for HCC in the Third Millennium.* Anticancer Res, 2017. **37**(2): p. 389-401.
182. Mazzaferro, V., et al., *Liver Transplantation for the Treatment of Small Hepatocellular Carcinomas in Patients with Cirrhosis.* New England Journal of Medicine, 1996. **334**(11): p. 693-700.

183. Head, H.W. and G.D. Dodd Iii, *Thermal ablation for hepatocellular carcinoma.* Gastroenterology, 2004. **127**(5, Supplement 1): p. S167-S178.
184. Seror, O., et al., *Large (≥5.0-cm) HCCs: Multipolar RF Ablation with Three Internally Cooled Bipolar Electrodes—Initial Experience in 26 Patients.* Radiology, 2008. **248**(1): p. 288-296.
185. Llovet, J.M., et al., *Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial.* The Lancet, 2002. **359**(9319): p. 1734-1739.
186. Bruix, J., M. Sala, and J.M. Llovet, *Chemoembolization for hepatocellular carcinoma.* Gastroenterology, 2004. **127**(5, Supplement 1): p. S179-S188.
187. Keating, G.M., *Sorafenib: A Review in Hepatocellular Carcinoma.* Targeted Oncology, 2017. **12**(2): p. 243-253.
188. Lawrence, T.S., et al., *Hepatic toxicity resulting from cancer treatment.* International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics, 1995. **31**(5): p. 1237-1248.
189. Hawkins, M.A. and L.A. Dawson, *Radiation therapy for hepatocellular carcinoma: from palliation to cure.* Cancer, 2006. **106**(8): p. 1653-63.
190. Merle, P., F. Mornex, and C. Trepo, *Innovative therapy for hepatocellular carcinoma: three-dimensional high-dose photon radiotherapy.* Cancer Lett, 2009. **286**(1): p. 129-33.
191. Mornex, F., et al., *Feasibility and efficacy of high-dose three-dimensional-conformal radiotherapy in cirrhotic patients with small-size hepatocellular carcinoma non-eligible for curative therapies--mature results of the French Phase II RTF-1 trial.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006. **66**(4): p. 1152-8.
192. Guillot, C., et al., *Update on hepatocellular carcinoma breakthroughs: poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors as a promising therapeutic strategy.* Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2014. **38**(2): p. 137-42.
193. Salem, R., et al., *Radioembolization results in longer time-to-progression and reduced toxicity compared with chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma.* Gastroenterology, 2011. **140**(2): p. 497-507.e2.
194. Ohri, N., et al., *Radiotherapy for Hepatocellular Carcinoma: New Indications and Directions for Future Study.* JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 2016. **108**(9): p. djw133-djw133.
195. Kao, J.H., et al., *Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers.* Gastroenterology, 2003. **124**(2): p. 327-334.
196. Fallot, G., C. Neuveut, and M.-A. Buendia, *Diverse roles of hepatitis B virus in liver cancer.* Current Opinion in Virology, 2012. **2**(4): p. 467-473.
197. Bonilla Guerrero, R. and L.R. Roberts, *The role of hepatitis B virus integrations in the pathogenesis of human hepatocellular carcinoma.* Journal of Hepatology, 2005. **42**(5): p. 760-777.
198. Martin-Lluesma, S., et al., *Hepatitis B virus X protein affects S phase progression leading to chromosome segregation defects by binding to damaged DNA binding protein 1.* Hepatology, 2008. **48**(5): p. 1467-76.
199. Wen, Y., et al., *Interaction of hepatitis B viral oncoprotein with cellular target HBXIP dysregulates centrosome dynamics and mitotic spindle formation.* J Biol Chem, 2008. **283**(5): p. 2793-803.

200. Hildt, E., et al., *The PreS2 activator MHBs(t) of hepatitis B virus activates c-raf-1/Erk2 signaling in transgenic mice.* The EMBO Journal, 2002. **21**(4): p. 525-535.
201. Chemin, I. and F. Zoulim, *Hepatitis B virus induced hepatocellular carcinoma.* Cancer Lett, 2009. **286**(1): p. 52-9.
202. Pollicino, T., et al., *Hepatitis B virus PreS/S gene variants: pathobiology and clinical implications.* J Hepatol, 2014. **61**(2): p. 408-17.
203. Hsieh, Y.-H., et al., *Pre-S mutant surface antigens in chronic hepatitis B virus infection induce oxidative stress and DNA damage.* Carcinogenesis, 2004. **25**(10): p. 2023-2032.
204. Liu, S., et al., *Associations Between Hepatitis B Virus Mutations and the Risk of Hepatocellular Carcinoma: A Meta-Analysis.* JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 2009. **101**(15): p. 1066-1082.
205. Lin, B. and D.A. Anderson, *A Vestigial X Open Reading Frame in Duck Hepatitis B Virus.* Intervirology, 2000. **43**(3): p. 185-190.
206. Tu, H., et al., *Biological Impact of Natural COOH-Terminal Deletions of Hepatitis B Virus X Protein in Hepatocellular Carcinoma Tissues.* Cancer Research, 2001. **61**(21): p. 7803.
207. Hwang, G.Y., et al., *Detection of the hepatitis B virus X protein (HBx) antigen and anti-HBx antibodies in cases of human hepatocellular carcinoma.* J Clin Microbiol, 2003. **41**(12): p. 5598-603.
208. Peng, Z., et al., *Integration of the hepatitis B virus X fragment in hepatocellular carcinoma and its effects on the expression of multiple molecules: A key to the cell cycle and apoptosis.* International Journal of Oncology 2005. **26**(2): p. 467-473.
209. Terradillos, O., et al., *The hepatitis B virus X gene potentiates c-myc-induced liver oncogenesis in transgenic mice.* Oncogene, 1997. **14**(4): p. 395-404.
210. Slagle, B.L., et al., *Increased sensitivity to the hepatocarcinogen diethylnitrosamine in transgenic mice carrying the hepatitis B virus X gene.* Mol Carcinogen, 1996. **15**(4): p. 261-269.
211. Quetier, I., et al., *C-terminal-truncated hepatitis B virus X protein enhances the development of diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinogenesis.* Journal of General Virology, 2015. **96**(3): p. 614-625.
212. Guerrieri, F., et al., *Genome-wide identification of direct HBx genomic targets.* BMC Genomics, 2017. **18**: p. 184.
213. Mahe, Y., et al., *Hepatitis B virus X protein transactivates human interleukin 8 gene through acting on nuclear factor kB and CCAAT/enhancer-binding protein-like cis-elements.* J.Biol.Chem., 1991. **266**(21): p. 13759-13763.
214. Yoo, Y.D., et al., *TGF-beta-induced cell-cycle arrest through the p21(WAF1)/(CIP1)-G1 cyclin/Cdks-p130 pathway in gastric-carcinoma cells.* Int J Cancer, 1999. **83**(4): p. 512-517.
215. Park, I.Y., et al., *Aberrant epigenetic modifications in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis B virus X protein.* Gastroenterology, 2007. **132**(4): p. 1476-94.
216. Lee, J.-O., et al., *Hepatitis B virus X protein represses E-cadherin expression via activation of DNA methyltransferase 1.* Oncogene, 2005. **24**(44): p. 6617-6625.
217. Tang, H., et al., *Hepatitis B virus X protein sensitizes cells to starvation-induced autophagy via up-regulation of beclin 1 expression.* Hepatology, 2009. **49**(1): p. 60-71.
218. Terradillos, O., et al., *p53-independent apoptotic effects of the hepatitis B virus HBx protein in vivo and in vitro.* Oncogene, 1998. **17**(16): p. 2115-2123.

219. Yang, B. and M.J. Bouchard, *The Hepatitis B Virus X Protein Elevates Cytosolic Calcium Signals by Modulating Mitochondrial Calcium Uptake.* Journal of Virology, 2012. **86**(1): p. 313-327.
220. Truant, R., et al., *Direct interaction of the hepatitis B virus HBx protein with p53 leads to inhibition by HBx of p53 response element-directed transactivation.* J. Virol., 1995. **69**: p. 1851-1859.
221. Chung, T.-W., et al., *Hepatitis B Virus X Protein Modulates the Expression of PTEN by Inhibiting the Function of p53, a Transcriptional Activator in Liver Cells.* Cancer Research, 2003. **63**(13): p. 3453.
222. Lereau, M., et al., *Interactions between hepatitis B virus and aflatoxin B(1): effects on p53 induction in HepaRG cells.* J Gen Virol, 2012. **93**(Pt 3): p. 640-50.
223. Quetier, I., et al., *Hepatitis B virus HBx protein impairs liver regeneration through enhanced expression of IL-6 in transgenic mice.* J Hepatol, 2013. **59**(2): p. 285-91.
224. Studach, L.L., et al., *Polo-like kinase1 inhibition suppresses Hepatitis B virus X protein-induced transformation, in an in vitro model of liver cancer progression.* Hepatology (Baltimore, Md.), 2009. **50**(2): p. 414-423.
225. Diab, A.M., et al., *Polo-like-kinase 1 is a proviral host-factor for hepatitis B virus replication.* Hepatology, 2017: p. n/a-n/a.
226. Riviere, L., et al., *HBx relieves chromatin-mediated transcriptional repression of hepatitis B viral cccDNA involving SETDB1 histone methyltransferase.* J Hepatol, 2015. **63**(5): p. 1093-102.
227. Rivière, L., et al., *Virus de l'hépatite B et chromatine.* Med Sci (Paris), 2016. **32**(5): p. 455-458.
228. Decorsiere, A., et al., *Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor.* Nature, 2016. **531**(7594): p. 386-9.
229. Gerossier, L., et al., *Identification d'un nouveau facteur de restriction contre l'infection par le virus de l'hépatite B.* Med Sci (Paris), 2016. **32**(10): p. 808-812.
230. Guillot, C., et al., *PARP inhibition and the radiosensitizing effects of the PARP inhibitor ABT-888 in in vitro hepatocellular carcinoma models.* BMC Cancer, 2014. **14**: p. 603.
231. Tanaka, T., T. Nakatani, and T. Kamitani, *Inhibition of NEDD8-conjugation pathway by novel molecules: potential approaches to anticancer therapy.* Mol Oncol, 2012. **6**(3): p. 267-75.
232. Calistri, A., et al., *The ubiquitin-conjugating system: multiple roles in viral replication and infection.* Cells, 2014. **3**(2): p. 386-417.
233. Lin, G.Y., et al., *The V protein of the paramyxovirus SV5 interacts with damage-specific DNA binding protein.* Virology, 1998. **249**(1): p. 189-200.
234. Precious, B., et al., *Simian virus 5 V protein acts as an adaptor, linking DDB1 to STAT2, to facilitate the ubiquitination of STAT1.* J Virol, 2005. **79**(21): p. 13434-41.
235. Ulane, C.M. and C.M. Horvath, *Paramyxoviruses SV5 and HPIV2 assemble STAT protein ubiquitin ligase complexes from cellular components.* Virology, 2002. **304**(2): p. 160-6.
236. Ahn, J., et al., *HIV/Simian Immunodeficiency Virus (SIV) Accessory Virulence Factor Vpx Loads the Host Cell Restriction Factor SAMHD1 onto the E3 Ubiquitin Ligase Complex CRL4(DCAF1).* The Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(15): p. 12550-12558.

237. Gu, H. and B. Roizman, *The two functions of herpes simplex virus 1 ICP0, inhibition of silencing by the CoREST/REST/HDAC complex and degradation of PML, are executed in tandem.* J Virol, 2009. **83**(1): p. 181-7.
238. Li, T., et al., *Structure of DDB1 in complex with a paramyxovirus V protein: viral hijack of a propeller cluster in ubiquitin ligase.* Cell, 2006. **124**(1): p. 105-17.
239. Tanaka, Y., et al., *The hepatitis B virus X protein enhances AP-1 activation through interaction with Jab1.* Oncogene, 2005. **25**(4): p. 633-642.
240. Murphy, C.M., et al., *Hepatitis B Virus X Protein Promotes Degradation of SMC5/6 to Enhance HBV Replication.* Cell Rep, 2016. **16**(11): p. 2846-54.
241. Jeppsson, K., et al., *The maintenance of chromosome structure: positioning and functioning of SMC complexes.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(9): p. 601-14.
242. Kegel, A. and C. Sjogren, *The Smc5/6 complex: more than repair?* Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2010. **75**: p. 179-87.
243. De Piccoli, G., J. Torres-Rosell, and L. Aragon, *The unnamed complex: what do we know about Smc5-Smc6?* Chromosome Res, 2009. **17**(2): p. 251-63.
244. Taylor, E.M., et al., *Identification of the proteins, including MAGEG1, that make up the human SMC5-6 protein complex.* Mol Cell Biol, 2008. **28**(4): p. 1197-206.
245. Stephan, A.K., et al., *Roles of Vertebrate Smc5 in Sister Chromatid Cohesion and Homologous Recombinational Repair.* Molecular and Cellular Biology, 2011. **31**(7): p. 1369-1381.
246. Ju, L., et al., *SMC6 is an essential gene in mice, but a hypomorphic mutant in the ATPase domain has a mild phenotype with a range of subtle abnormalities.* DNA Repair (Amst), 2013. **12**(5): p. 356-66.
247. Harvey, S.H., et al., *Coordination of DNA Damage Responses via the Smc5/Smc6 Complex.* Molecular and Cellular Biology, 2004. **24**(2): p. 662-674.
248. Harris, R.S., J.F. Hultquist, and D.T. Evans, *The Restriction Factors of Human Immunodeficiency Virus.* Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(49): p. 40875-40883.
249. Kluge, S.F., D. Sauter, and F. Kirchhoff, *SnapShot: antiviral restriction factors.* Cell, 2015. **163**(3): p. 774-774 e1.
250. Doyle, T., C. Goujon, and M.H. Malim, *HIV-1 and interferons: who's interfering with whom?* Nat Rev Micro, 2015. **13**(7): p. 403-413.
251. Lilly, F., *Fv-2: Identification and Location of a Second Gene Governing the Spleen Focus Response to Friend Leukemia Virus in Mice2.* JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 1970. **45**(1): p. 163-169.
252. Sheehy, A.M., et al., *Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein.* Nature, 2002. **418**(6898): p. 646-650.
253. Perez-Caballero, D., et al., *Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells.* Cell, 2009. **139**(3): p. 499-511.
254. Laguette, N., et al., *SAMHD1 is the dendritic– and myeloid–cell–specific HIV–1 restriction factor counteracted by Vpx.* Nature, 2011. **474**(7353): p. 654-657.
255. Hrecka, K., et al., *Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein.* Nature, 2011. **474**(7353): p. 658-661.
256. Simon, V., N. Bloch, and N.R. Landau, *Intrinsic host restrictions to HIV-1 and mechanisms of viral escape.* Nat Immunol, 2015. **16**(6): p. 546-553.
257. Janahi, E.M. and M.J. McGarvey, *The inhibition of hepatitis B virus by APOBEC cytidine deaminases.* Journal of Viral Hepatitis, 2013. **20**(12): p. 821-828.

258. Turelli, P., et al., *Inhibition of hepatitis B virus replication by APOBEC3G.* Science, 2004. **303**(5665): p. 1829.
259. Suspène, R., et al., *Extensive editing of both hepatitis B virus DNA strands by APOBEC3 cytidine deaminases in vitro and in vivo.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(23): p. 8321-8326.
260. Lucifora, J., et al., *Dégradation spécifique de l'ADN nucléaire responsable de la persistance du virus de l'hépatite B.* Med Sci (Paris), 2014. **30**(8-9): p. 724-726.
261. Sommer, A.F.R., et al., *Restrictive influence of SAMHD1 on Hepatitis B Virus life cycle.* Scientific Reports, 2016. **6**: p. 26616.
262. Wang, H. and W.-S. Ryu, *Hepatitis B Virus Polymerase Blocks Pattern Recognition Receptor Signaling via Interaction with DDX3: Implications for Immune Evasion.* PLoS Pathogens, 2010. **6**(7): p. e1000986.
263. Livingston, C.M., et al., *Identifying and Characterizing Interplay between Hepatitis B Virus X Protein and Smc5/6.* Viruses, 2017. **9**(4).
264. Niu, C., et al., *The Smc5/6 Complex Restricts HBV when Localized to ND10 without Inducing an Innate Immune Response and Is Counteracted by the HBV X Protein Shortly after Infection.* PLoS ONE, 2017. **12**(1): p. e0169648.
265. Catez, F., et al., *Detection of the Genome and Transcripts of a Persistent DNA Virus in Neuronal Tissues by Fluorescent In situ Hybridization Combined with Immunostaining.* Journal of Visualized Experiments : JoVE, 2014(83): p. 51091.
266. Catez, F., et al., *HSV-1 genome subnuclear positioning and associations with host-cell PML-NBs and centromeres regulate LAT locus transcription during latency in neurons.* PLoS Pathog, 2012. **8**(8): p. e1002852.
267. Full, F., et al., *Kaposi's Sarcoma Associated Herpesvirus Tegument Protein ORF75 Is Essential for Viral Lytic Replication and Plays a Critical Role in the Antagonization of ND10-Instituted Intrinsic Immunity.* PLoS Pathogens, 2014. **10**(1): p. e1003863.
268. Adler, M., et al., *Human cytomegalovirus immediate-early gene expression is restricted by the nuclear domain 10 component Sp100.* Journal of General Virology, 2011. **92**(7): p. 1532-1538.
269. Potts, P.R., M.H. Porteus, and H. Yu, *Human SMC5/6 complex promotes sister chromatid homologous recombination by recruiting the SMC1/3 cohesin complex to double-strand breaks.* EMBO J, 2006. **25**(14): p. 3377-88.
270. Kegel, A. and C. Sjögren, *The Smc5/6 Complex: More Than Repair?* Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 2011.
271. Irmisch, A., et al., *Smc5/6 maintains stalled replication forks in a recombination-competent conformation.* The EMBO Journal, 2009. **28**(2): p. 144-155.
272. Potts, P.R. and H. Yu, *The SMC5/6 complex maintains telomere length in ALT cancer cells through SUMOylation of telomere-binding proteins.* Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**(7): p. 581-590.
273. Stephan, A.K., et al., *Roles of vertebrate Smc5 in sister chromatid cohesion and homologous recombinational repair.* Mol Cell Biol, 2011. **31**(7): p. 1369-81.
274. S., B.-S., et al., *SMC5 and MMS21 are required for chromosome cohesion and mitotic progression.* Cell Cycle, 2009. **8**(14): p. 2211-2218.
275. Outwin, E.A., et al., *Smc5-Smc6-Dependent Removal of Cohesin from Mitotic Chromosomes.* Molecular and Cellular Biology, 2009. **29**(16): p. 4363-4375.
276. Wu, N. and H. Yu, *The Smc complexes in DNA damage response.* Cell Biosci, 2012. **2**: p. 5.

277. Gallego-Paez, L.M., et al., *Smc5/6-mediated regulation of replication progression contributes to chromosome assembly during mitosis in human cells.* Mol Biol Cell, 2014. **25**(2): p. 302-17.
278. Jacome, A., et al., *NSMCE2 suppresses cancer and aging in mice independently of its SUMO ligase activity.* The EMBO Journal, 2015. **34**(21): p. 2604-2619.
279. Pearl, L.H., et al., *Therapeutic opportunities within the DNA damage response.* Nat Rev Cancer, 2015. **15**(3): p. 166-80.
280. Mladenov, E., et al., *DNA double-strand-break repair in higher eukaryotes and its role in genomic instability and cancer: Cell cycle and proliferation-dependent regulation.* Semin Cancer Biol, 2016. **37-38**: p. 51-64.
281. Weitzman, M.D., C.E. Lilley, and M.S. Chaurushiya, *Genomes in Conflict: Maintaining Genome Integrity During Virus Infection.* Annual Review of Microbiology, 2010. **64**(1): p. 61-81.
282. Schreiner, S. and M. Nassal, *A Role for the Host DNA Damage Response in Hepatitis B Virus cccDNA Formation-and Beyond?* Viruses, 2017. **9**(5).
283. Magdalou, I., et al., *The causes of replication stress and their consequences on genome stability and cell fate.* Seminars in Cell & Developmental Biology, 2014. **30**: p. 154-164.
284. Gaillard, H., T. Garcia-Muse, and A. Aguilera, *Replication stress and cancer.* Nat Rev Cancer, 2015. **15**(5): p. 276-89.
285. Satoh, M.S. and T. Lindahl, *Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair.* Nature, 1992. **356**(6367): p. 356-358.
286. D'Silva, I., et al., *Relative affinities of poly(ADP-ribose) polymerase and DNA-dependent protein kinase for DNA strand interruptions.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1999. **1430**(1): p. 119-126.
287. Lieber, M.R., *The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End Joining Pathway.* Annual review of biochemistry, 2010. **79**: p. 181-211.
288. Bryant, H.E., et al., *PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination.* The EMBO Journal, 2009. **28**(17): p. 2601-2615.
289. Fojo, T. and S. Bates, *Mechanisms of Resistance to PARP Inhibitors—Three and Counting.* Cancer Discovery, 2013. **3**(1): p. 20.
290. Murai, J., et al., *Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors.* Cancer Res, 2012. **72**(21): p. 5588-99.
291. Murai, J., et al., *Stereospecific PARP trapping by BMN 673 and comparison with olaparib and rucaparib.* Mol Cancer Ther, 2014. **13**(2): p. 433-43.
292. Goodarzi, A.A., P. Jeggo, and M. Lobrich, *The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: Getting the strong, silent type to relax.* DNA Repair, 2010. **9**(12): p. 1273-1282.
293. Petermann, E., et al., *Hydroxyurea-Stalled Replication Forks Become Progressively Inactivated and Require Two Different RAD51-Mediated Pathways for Restart and Repair.* Molecular Cell, 2010. **37**(4): p. 492-502.
294. Agrawal, R.K., et al., *Hydroxyurea in Sickle Cell Disease: Drug Review.* Indian Journal of Hematology & Blood Transfusion, 2014. **30**(2): p. 91-96.
295. Farmer, H., et al., *Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy.* Nature, 2005. **434**(7035): p. 917-921.

296. Bryant, H.E., et al., *Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase.* Nature, 2005. **434**(7035): p. 913-917.
297. Jackson, S.P. and T. Helleday, *Drugging DNA repair.* Science, 2016. **352**(6290): p. 1178.
298. Gao, J., et al., *Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the cBioPortal.* Science signaling, 2013. **6**(269): p. pl1-pl1.
299. Cerami, E., et al., *The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data.* Cancer Discovery, 2012. **2**(5): p. 401.
300. Chiker, S., et al., *Cdk5 promotes DNA replication stress checkpoint activation through RPA-32 phosphorylation, and impacts on metastasis free survival in breast cancer patients.* Cell Cycle, 2015. **14**(19): p. 3066-3078.
301. Sleeth, K.M., et al., *RPA Mediates Recombination Repair During Replication Stress and Is Displaced from DNA by Checkpoint Signalling in Human Cells.* Journal of Molecular Biology, 2007. **373**(1): p. 38-47.
302. Becker, S.A., et al., *Hepatitis B virus X protein interferes with cellular DNA repair.* J Virol, 1998. **72**(1): p. 266-72.
303. Jia, L., X.W. Wang, and C.C. Harris, *Hepatitis B virus X protein inhibits nucleotide excision repair.* Int J Cancer, 1999. **80**(6): p. 875-9.
304. Wu, X.Y., et al., *Hepatitis B virus X protein disrupts DNA interstrand crosslinking agent mitomycin C induced ATR dependent intra-S-phase checkpoint.* Eur J Cancer, 2008. **44**(11): p. 1596-602.
305. Madden, C.R., M.J. Finegold, and B.L.U.-h.w.s.c.s.a.B.T.H.-X.-S.a.c.d.b.c.b.d.f.d. Slagle, *Hepatitis B virus X protein acts as a tumor promoter in development of diethylnitrosamine-induced preneoplastic lesions.* Journal of Virology, 2001. **75**(8): p. 3851-3858.
306. Madden, C.R., M.J. Finegold, and B.L. Slagle, *Expression of hepatitis B virus X protein does not alter the accumulation of spontaneous mutations in transgenic mice.* J Virol, 2000. **74**(11): p. 5266-72.
307. Amaddeo, G., et al., *Integration of tumour and viral genomic characterisations in HBV-related hepatocellular carcinomas.* Gut, 2015. **64**(5): p. 820-829.
308. Na, T.Y., et al., *Interaction of hepatitis B virus X protein with PARP1 results in inhibition of DNA repair in hepatocellular carcinoma.* Oncogene, 2016. **35**(41): p. 5435-5445.
309. Ko, H.L., et al., *Reduced ADP-ribosylation by PARP1 natural polymorphism V762A and by PARP1 inhibitors enhance Hepatitis B virus replication.* Journal of Viral Hepatitis, 2013. **20**(9): p. 658-665.

L'influence de HBx sur la réplication du virus de l'Hépatite B et les conséquences sur la cellule

L'infection par le virus de l'hépatite B (HBV) est problème majeur de santé publique mondial car (i) en dépit d'un vaccin efficace plus de 240 millions de personnes sont infectées de façon chronique par HBV, et (ii) les traitements curatifs actuels ne permettent pas l'élimination complète de l'ADN viral. Ainsi, les individus infectés ont un risque accru de développer un carcinome hépatocellulaire (CHC). Comprendre les mécanismes de réplication du virus et son rôle dans la survenue du CHC reste un enjeu majeur.

Le rôle de la protéine HBx dans l'infection par HBV et l'oncogenèse viro-induite reste mal connu, malgré un grand nombre de publications, car les fonctions décrites jusqu'alors sont limitées à des contextes d'études particuliers, souvent loin des conditions physiologiques.

Mes travaux de thèse reposent sur l'utilisation de modèles d'études proches de la physiologie naturelle d'une infection par HBV, notamment des cellules primaires infectables *in vitro*. Le but premier de mes travaux repose sur la compréhension du rôle indispensable de HBx dans la réplication du virus. J'ai pu dans un premier temps confirmer l'implication de HBx dans la régulation épigénétique de l'ADNccc. Dans une seconde étude nous avons démontré que HBx agit sur la réplication de HBV essentiellement via son interaction avec DDB1 pour contrer le facteur de restriction nouvellement identifié, le complexe SMC5/6, en induisant sa dégradation. Ce facteur de restriction pourrait permettre de bloquer la transcription de l'ADN viral au niveau épigénétique. Ce nouveau rôle inattendu de SMC5/6 ouvre de nombreux axes de recherche, notamment sur les mécanismes de restriction des virus à ADN épisomal.

SMC5/6 est connu, entre autres, pour son implication dans les voies de réparation de l'ADN : la dernière partie de ce manuscrit démontre que sa dégradation dans les cellules infectées, altère ces mécanismes et sensibilise les cellules aux dommages à l'ADN, induits notamment par la radiothérapie. En effet, les cellules subissent lors de l'irradiation un grand nombre de cassures simples et doubles brins qui en l'absence de système de réparation efficace ne peuvent pas être réparées et conduisent à la mort de la cellule. Des études transcriptomiques à grande échelles nous ont permis de décrire une altération des voies de réparations, notamment une surexpression des protéines de la famille PARP dans les CHC de différentes étiologies. Ainsi, en combinant ces deux observations, nous avons démontré que l'utilisation d'inhibiteurs de PARP en combinaison avec la radiothérapie pourrait s'avérer une nouvelle piste thérapeutique dans le traitement des CHC, notamment pour ceux d'origine HBV exprimant la protéine HBx.

Mots clés
Hépatite B, HBx, SMC5/6, Facteurs de restriction, Réplication virale, Carcinome Hépatocellulaire, Inhibiteurs de PARP

Laboratoire de recherche :
Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon
Equipe Hepatocarcinogénèse et Infections virales
151 cours Albert Thomas
69003 Lyon