



HAL
open science

Analyse du mécanisme d'entrée du virus de l'hépatite B : Identification d'un nouveau déterminant de l'infectivité

Charlotte Lepère - Douard

► To cite this version:

Charlotte Lepère - Douard. Analyse du mécanisme d'entrée du virus de l'hépatite B : Identification d'un nouveau déterminant de l'infectivité. Biologie cellulaire. Université Rennes 1, 2009. Français. NNT: . tel-00498099

HAL Id: tel-00498099

<https://theses.hal.science/tel-00498099>

Submitted on 6 Jul 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1
Mention : BIOLOGIE

Ecole doctorale Vie – Agronomie – Santé

présentée par

Charlotte Lepère-Douard

préparée à l'unité de recherche INSERM U522 « Régulation des équilibres fonctionnels du foie normal et pathologique », et à l'unité SeRAIC EA 4427 « Signalisation et Réponse aux agents infectieux et chimiques ».
Science de la vie et de l'environnement

**Analyse du mécanisme
d'entrée du Virus de
l'Hépatite B :
identification d'un
nouveau déterminant
de l'infectivité**

**Thèse soutenue à Rennes
le 2 décembre 2009**

devant le jury composé de :

Eve-Isabelle PECHEUR

CR1, Université de Lyon, *rapporteur*

Camille SUREAU

DR, Université de Paris 5 et Paris 7, *rapporteur*

Jean-François HUBERT

PU, Université de Rennes 1, *examineur*

Philippe ROINGEARD

PUPH, Université de Tours, *examineur*

Dominique GUYADER

PUPH, Université de Rennes 1, *directeur de thèse*

Philippe GRIPON

CR1, Université de Rennes 1, *co-directeur de thèse*

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'unité INSERM 522, dirigée par le Dr Christiane Guguen-Guillouzo, et de l'unité EA-SeRAIC 4427 dirigée par le Dr Dominique Lagadic-Gossmann. Je tiens à remercier le Dr Guguen-Guillouzo de m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je remercie également le Dr Lagadic-Gossmann pour son accueil, sa disponibilité et son intérêt dans mon travail de thèse. La direction de cette thèse a été assurée par le Pr Dominique Guyader que je tiens à remercier pour sa disponibilité et son aide précieuse pour la correction de la partie concernant les aspects cliniques de l'hépatite B.

Tout d'abord, je tiens à remercier le Dr Philippe Gripon, ayant encadré ma thèse, qui m'a permis de réaliser ce travail et aux côtés de qui j'ai pu découvrir le métier de chercheur. Outre sa très large culture scientifique, il a mis à profit sa rigueur et son esprit critique, pour m'enseigner les fondements du raisonnement scientifique et du métier de chercheur qui me seront utiles dans ma vie professionnelle future. Je le remercie tout particulièrement pour sa disponibilité, son écoute et sa confiance qui m'ont permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions. Merci également pour toutes les discussions que nous avons pu partager, tant au niveau scientifique que dans tout autre domaine. Merci de m'avoir donné l'opportunité de présenter mes résultats lors de congrès internationaux, jusqu'en Californie aux Etats-Unis, puis à Tours en France. Et enfin, merci pour avoir pris le temps de corriger ce manuscrit.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance envers Eve-Isabelle Pécheur et Camille Sureau qui ont accepté de faire partie de ce jury en qualité de rapporteurs et de me donner de leur temps afin de juger et d'améliorer ce travail. Je tiens également à remercier Philippe Roingard et Jean-François Hubert qui ont accepté de participer à ce jury et d'examiner ce travail.

Je voudrais également remercier les membres de l'équipe pédagogique de biologie cellulaire pour les quatre années d'enseignement que j'ai eu la chance de mener dans la bonne humeur en leur compagnie. Particulièrement, je souhaite remercier le Dr Claire Piquet-Pellorce pour sa disponibilité, ses conseils avisés, et les nombreuses discussions que nous avons pu partager.

L'occasion m'est également donnée de pouvoir remercier tous les membres du laboratoire, notamment toute l'équipe de doctorants et de post doctorants : Nadia, Claire, Adeline, Kélig, Maud, Emilie, Christophe, Delphine, Sasse-Fanie, Emmanuelle, Marie-Laure,

Lénaïc, Hélène sans qui je n'aurais pu réaliser cette thèse. Leur bonne humeur de tous les jours et la joie de les retrouver tous les matins au laboratoire m'a permis de réaliser cette thèse dans une atmosphère joyeuse que je n'oublierais pas.

Je souhaite remercier très particulièrement Maud Trotard, doctorante, pour ces trois années passées ensemble. Merci pour.... tout, pour les discussions professionnelles ou non, ta disponibilité, tes conseils, ton écoute, ton aide précieuse, les moments de détente, les fous rires, notre complicité, nos coups de gueules, etc., il y en a tellement que je ne peux tous les énumérer, alors juste encore une fois MILLE MERCI à toi.

Je souhaite également remercier très particulièrement le Dr Jacques Le Seyec pour sa disponibilité, sa compagnie toujours agréable et ses nombreux conseils tant professionnels que personnels. Tu as toujours été là lorsque j'en avais besoin et je t'en remercie profondément.

Je tiens à remercier tous mes amis et tout particulièrement Marie, Matthieu, Romain, Olivia, Caroline, Sandrine, Mickael, Rachelle, Morgan, Thomas, Elinore qui ont su m'épauler durant toutes ces années.

Merci à toute ma famille, à mes parents, à ma sœur adorée et sa famille, pour tous les moments de bonheurs que vous m'avez offert et que l'on continue de partager tous les jours. Sans vous rien n'aurait été possible et vous m'avez toujours soutenue. Merci pour tout. Merci également à ma belle famille, Jean-Pierre, Rose-Anne, Marie-Cécile et Julien, qui font tout simplement parti de la famille et sur qui je peux toujours compter.

Enfin, je souhaite terminer ces remerciements par un ENORME MERCI à mon mari adoré, David, qui a toujours été à mes côtés et qui m'a offert du réconfort et du bonheur tous les jours dès que je rentrais à la maison. Ce n'est pas toujours facile d'avoir un femme qui fait une thèse... qui doit travailler le week end et pendant les vacances mais tu m'as toujours soutenue et aidée. Je n'aurais pas pu y arriver sans toi, merci. Et enfin un petit merci à Kidi pour ses câlins réconfortants.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	2
SOMMAIRE	4
INDEX DES FIGURES.....	6
LISTE DES ABREVIATIONS.....	7
AVANT-PROPOS	8
INTRODUCTION GENERALE.....	9
DECOUVERTE DU VIRUS DE L'HEPATITE B	9
I. <i>Premières observations</i>	9
II. <i>Découverte des hépatites sériques</i>	9
III. <i>Première observation du virus</i>	10
IV. <i>Découverte et histoire du vaccin</i>	11
V. <i>Découvertes récentes</i>	13
CARACTERISTIQUES CLINIQUES DU VHB	14
I. <i>Prévalence de l'infection par le VHB</i>	14
A. Dans le monde	14
B. En France.....	14
II. <i>Aspects cliniques de l'infection par le VHB</i>	15
A. Transmission.....	15
B. Manifestations cliniques	15
III. <i>Traitement de l'infection chronique par le VHB</i>	21
A. Thérapies à base d'interféron	21
B. Inhibiteurs de la polymérase virale.....	22
BIOLOGIE DU VHB	24
VIRUS APPARENTES ET SATELLITES	24
I. <i>Famille des hepadnaviridae</i>	24
A. Caractéristiques communes des hepadnavirus	25
B. Caractéristiques divergentes des hepadnavirus	25
C. Les génotypes du VHB.....	27
II. <i>Virus satellite</i>	29
CARACTERISTIQUES STRUCTURALES	30
I. <i>Structure des particules virales complètes et des particules subvirales</i>	30
A. Particules subvirales	30
B. Particules virales complètes	32
II. <i>Nucléocapside</i>	41
III. <i>Génome viral</i>	43
A. Structure	43
B. Organisation génétique	43
CYCLE VIRAL.....	45
I. <i>Attachement</i>	45
A. Implication des protéines de l'enveloppe virale.....	46
B. Implication de protéines cellulaires et autres	54
C. Attachement du DHBV.....	59
II. <i>Libération des nucléocapsides</i>	63
A. Compartiment cellulaire	63
B. Mécanisme.....	69
III. <i>Adressage nucléaire et décapsidation</i>	80
IV. <i>Conversion de l'ADN relaxé circulaire en ADN superenroulé</i>	82
V. <i>Transcription virale</i>	83
A. Structures et fonctions des transcrits viraux	83
B. Mécanisme et régulation de la transcription.....	84
VI. <i>Traduction et maturation des protéines</i>	86
A. Polymérase virale	86
B. Antigène de la capsid et antigène e.....	86
C. Protéine X.....	87
D. Protéines de l'enveloppe virale	87

VII. Encapsidation et synthèse de l'ADN viral	87
A. Encapsidation de l'ARN pré-génome	87
B. Synthèse de l'ADN viral	88
VIII. Assemblage et sécrétion des particules virales	89
A. Particules subvirales	89
B. Particules virales complètes	91
OBJECTIFS DE LA THESE	93
RESULTATS	95
PARTIE I : ANALYSE DU ROLE DU MOTIF DE TRANSLOCATION PRESENT DANS LE DOMAINE PRE-S2 DES PROTEINES D'ENVELOPPE DU VHB LORS DE L'ETAPE D'INFECTION.....	95
I. Introduction	95
II. Stratégie expérimentale.....	96
III. Résultats et discussion	96
IV. Article I	97
PARTIE II : ANALYSE DU ROLE DU PEPTIDE DE FUSION PUTATIF DES PROTEINES D'ENVELOPPE DU VHB LORS DE L'ETAPE D'INFECTION	98
I. Introduction	98
II. Stratégie expérimentale.....	98
III. Résultats	99
IV. Discussion	100
V. Article II	102
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	103
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	113
RESUMES.....	140

INDEX DES FIGURES

Figure 1. Distribution géographique des infections chroniques par le VHB	Page 14
Figure 2. Manifestations cliniques d'une infection par le VHB	Page 15
Figure 3. Les phases d'une infection chronique par le VHB	Page 17
Figure 4. Evolutions possibles d'une infection chronique par le VHB	Page 18
Figure 5. Arbre phylogénétique des orthohepadnavirus	Page 26
Figure 6. Répartition géographique des génotypes du VHB	Page 27
Figure 7. Photos de microscopie électronique des particules virales	Page 30
Figure 8. Schématisation des particules subvirales	Page 30
Figure 9. Reconstruction 3D de particules subvirales	Page 31
Figure 10. Schématisation d'une particule virale complète	Page 32
Figure 11. Structure et modifications post-traductionnelles des protéines de surface du VHB	Page 33
Figure 12. Topologie prédite des protéines d'enveloppe du VHB	Page 33
Figure 13. Profil d'hydrophobicité de la protéine L du VHB	Page 34
Figure 14. Topologie prédite de la grande protéine d'enveloppe du DHBV	Page 37
Figure 15. Modèle 3D d'une particule virale complète	Page 39
Figure 16. Particules virales compactes et particules virales espacées	Page 40
Figure 17. Organisation des antigènes de surface dans l'enveloppe virale	Page 40
Figure 18. Reconstruction 3D de capsides natives	Page 42
Figure 19. Organisation du génome viral	Page 43
Figure 20. Cycle viral du VHB	Page 45
Figure 21. Régions des protéines d'enveloppe du VHB nécessaires à l'infection	Page 49
Figure 22. Partenaires protéiques ou autres interagissant avec les protéines de surface du VHB	Page 55
Figure 23. Modèle représentant le mécanisme de translocation	Page 70
Figure 24. Séquence du peptide de fusion putatif des protéines d'enveloppe du VHB	Page 76
Figure 25. Séquence des peptides de fusion du VHB et du DHBV	Page 104
Figure 26. Variabilité dans les protéines de surface et dans la polymérase virale	Page 105
Figure 27. Modèle <i>in silico</i> de la structure 3D de la protéine S	Page 108

NB : Les figures sont placées en vis à vis des numéros de page indiqués ci-dessus.

LISTE DES ABREVIATIONS

AA	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNccc	ADN superenroulé, (covalently closed circular)
ADNrc	ADN relaxé circulaire
AFSSAPS	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
Ag	Antigène
AGL	Antigenic loop
ASAT, ALAT	Transaminases
CHC	Carcinome hépatocellulaire
CPN	Complexe des pores nucléaires
CPD	Carboxypeptidase D
C-term / N-term	Extrémité C / N terminale
CYL	Cytoplasmic loop
DMSO	Di-méthyl-sulfoxyde
DR1, DR2	Direct repeat
ERGIC	Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment
GDC	Glycine décarboxylase
HA	Hémagglutinine
HBc	Hépatite B core
HBe	Hépatite B e
HBs	Hépatite B surface
HC	Hydrophobic cluster
INVS	Institut national de veille sanitaire
L	Grande protéine du VHB
M	Protéine moyenne du VHB
NLS	Nuclear localization signal
OMS	Organisation mondiale de la santé
PEG	Polyéthylène glycol
PEST	Séquence peptidique riche en résidus Pro, Glu, Ser et Thr.
RE	Réticulum endoplasmique
S	Petite protéine du VHB
T3, T4	Triangulation égale à 3 ou 4
TLM	Translocation motif
TM	Transmembranaire
VHB	Virus de l'hépatite B
VHC	Virus de l'hépatite C
VHD	Virus de l'hépatite D
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
WT	Wild type (sauvage)

AVANT-PROPOS

L'hépatite B est une maladie infectieuse grave, extrêmement contagieuse, qui provoquerait plus de 600 000 décès par an dans le monde (Goldstein et al, 2005). On estime à 2 milliards le nombre de personnes touchées par cette maladie, dont plus de 350 millions sont des porteurs chroniques capables de transmettre le virus pendant des années (WHO, 2002). Entre 15 et 40 % de ces derniers développent des complications hépatiques de type cirrhose, lésion du foie et hépatocarcinome (Lavanchy, 2004; Lok, 2002), ce dernier constituant le cinquième cancer le plus fréquent dans le monde (Parkin et al, 2001).

Malgré l'existence d'un vaccin efficace, recommandé par l'organisation mondiale de la santé depuis 1991, le nombre de malades atteints chroniquement par la maladie reste très élevé. Pour ces malades, deux types de traitement sont disponibles, basés soit sur l'utilisation d'interférons pour stimuler les défenses antivirales de l'hôte, soit sur l'utilisation d'inhibiteurs de la polymérase virale qui bloquent la multiplication des virus. Bien que de nombreux progrès aient été réalisés dans la prise en charge thérapeutique des malades, les protocoles à base d'interféron ne sont efficaces que dans environ 40 % des cas et sont responsables d'importants effets secondaires. En ce qui concerne les antiviraux, ils doivent être utilisés à très long terme et sont parfois responsables de l'apparition de virus résistants au traitement. Dans ce contexte, la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques afin de développer de nouveaux antiviraux contre le virus de l'hépatite B (VHB), est un enjeu important. Ainsi, une meilleure compréhension du cycle viral, et particulièrement du mécanisme par lequel le virus entre dans les cellules, pourrait fournir les bases nécessaires au développement de nouvelles thérapeutiques qui inhibent les premières étapes de l'infection, comme cela a été récemment illustré par la découverte d'un inhibiteur de l'entrée virale dérivé des protéines de surface du virus (Gripon et al, 2005; Petersen et al, 2008).

Une des approches utilisées pour analyser le mécanisme d'entrée d'un virus au sein de sa cellule cible consiste à étudier ses protéines de surface. Ainsi, au cours de ma thèse, j'ai recherché la présence de nouveaux déterminants de l'infectivité dans les protéines de surface du VHB afin d'essayer de mieux comprendre son mécanisme d'entrée.

La première partie de ce manuscrit correspond à une introduction générale dans laquelle j'ai souhaité présenter l'histoire de la découverte du virus de l'hépatite B, puis les manifestations cliniques d'une hépatite virale B. Ensuite, l'introduction se poursuit par la description de la structure du virus, et particulièrement de celle de ses protéines de surface, puis elle se termine par la description des différentes étapes du cycle viral. Dans un deuxième temps, j'ai présenté les objectifs de cette thèse dans le contexte actuel de la recherche. Enfin, mes principaux résultats sont rapportés dans deux articles, publiés en anglais dans « Journal of Virology », dont j'ai résumé en français les points clés dans les pages précédents chaque publication. Pour conclure, j'ai voulu clore ce manuscrit par une discussion générale sur l'ensemble de nos résultats et sur leurs perspectives.

INTRODUCTION GENERALE

DECOUVERTE DU VIRUS DE L'HEPATITE B

I. Premières observations

Déjà plus d'un siècle s'est écoulé depuis l'idée originale proposée par Mc Donald en 1908 selon laquelle l'hépatite aiguë serait une maladie infectieuse transmise par un virus pathogène (le mot virus signifiant à l'époque : agent subcellulaire infectieux pouvant être filtré) (McDonald, 1908). Si l'on remonte encore un peu plus loin en 1885, Lürman et Jehn étaient respectivement les témoins d'épidémies de « jaunisse » chez les travailleurs d'un chantier naval et les détenus d'un asile (Jehn, 1885; Lürman, 1885). Ces deux populations ayant récemment été immunisées contre la variole grâce à un vaccin consistant en une préparation de lymphes humaine, Lürman en a déduit qu'il était probable que le vaccin soit la cause de la maladie (Lürman, 1885), observant ainsi pour la première fois des « hépatites sériques », aujourd'hui connues sous le nom d'hépatites B et C, dont la nature infectieuse sera postulée 23 ans plus tard par Mc Donald. De nombreux cas similaires à ceux observés par Lürman et Jehn jusque dans les années 40 ont entériné l'hypothèse selon laquelle la transmission des « hépatites sériques » était provoquée par des aiguilles contaminées par du sang, l'administration de vaccins dérivés de tissus humains tels que ceux de la variole ou de la fièvre jaune, et enfin l'administration de produits sanguins tels que l'insuline.

II. Découverte des hépatites sériques

Durant la seconde guerre mondiale, la propagation des hépatites virales chez un grand nombre de victimes transfusées a déclenché le développement de projets de recherche majeurs sur la maladie aux Etats-Unis et en Angleterre. Ainsi, les premiers résultats de ces études, souvent basées sur la transmission délibérée d'hépatites infectieuses à des sujets volontaires, apparaissent à la fin de la guerre (Havens, 1946; MacCallum FO, 1944; MacCullum, 1947; Neefe JR, 1945; Paul JR, 1945). Ils permettent pour la première fois de faire une distinction claire entre les infections aiguës transmises par des aliments souillés par le virus, ou « hépatites A », et les hépatites sériques, ou « hépatites B », dont le temps d'incubation est de plusieurs mois et qui conduisent parfois à la chronicité. Bien que ces résultats solides concernant l'étiologie virale des hépatites fussent longtemps controversés par la communauté médicale de l'Europe continentale, de nombreuses recherches visant à identifier et isoler le ou les virus responsables des hépatites virales ont été menées durant les années 1950 et 1960. Pourtant, c'est une étude réalisée par Blumberg *et al* en 1965 sur un tout autre sujet, à savoir l'étude du polymorphisme génétique des protéines sériques, qui a permis d'isoler et d'étudier pour la première fois sans en

avoir conscience, le virus de l'hépatite B (Blumberg et al, 1965). C'est la technique mise au point par ces chercheurs qui a conduit à l'isolement du virus. En recherchant des anticorps dirigés contre différentes formes polymorphiques de protéines sériques chez des patients multi-transfusés, ils ont identifié un anticorps réagissant contre le sérum d'un australien dont l'antigène ciblé fut appelé « Australia antigen » (Au) (connu aujourd'hui sous le nom d'antigène de surface du VHB : AgHBs) (Blumberg, 2002; Blumberg et al, 1965). Plusieurs études ont ensuite permis de corrélérer la présence de cet antigène avec celle d'hépatites et l'ont identifié comme un constituant du virus responsable des hépatites sériques B qui sera alors appelé virus de l'hépatite B (VHB) à partir des années 70 (Blumberg et al, 1967; Giles et al, 1969; Gocke & Kavey, 1969; London et al, 1969; Okochi & Murakami, 1968; Prince, 1968). L'analyse des dons de sang et l'exclusion des lots contaminés par l'antigène (Au) permettront dès 1969 de réduire de façon significative le développement d'hépatites « post-transfusion » (Blumberg, 1977; Senior et al, 1974).

III. Première observation du virus

En 1970, les premières images de virus issus de sérum de patients présentant une hépatite virale associée à l'antigène « Australia » sont publiées par Dane et al (Dane et al, 1970). On y observe trois types de particules virales : des petites sphères et des bâtonnets de 20 nm de diamètre environ, ainsi que des particules plus grosses de 42 nm, connues depuis sous le nom de particules de Dane, correspondant au virus complet et contenant une capsid de 30 nm environ. Les découvertes qui s'enchaînent alors rapidement permettent d'établir la structure des virions et du génome viral ; les plus marquantes d'entre elles sont résumées dans le tableau 1 ci-dessous.

Date	Nature	Auteurs et description de la découverte
1971	HBc	Almeida et al. décrivent l'antigène de capsid qu'ils nomment HBc. Il est issu de particules de Dane traitées par des détergents (Almeida et al, 1971).
1972	HBe	Magnius et Espmark découvrent l'antigène <i>e</i> (HBe), qui contrairement à l'antigène HBs est une protéine soluble présente dans le sérum des patients infectés par le VHB (Magnius & Espmark, 1972a; Magnius & Espmark, 1972b). La présence d'anticorps dirigés contre cet antigène sera rapidement corrélée à un bon pronostic concernant l'évolution de la maladie.
1972	Sous-types	Le Bouvier et al. identifient les déterminant immunogéniques <i>a</i> , <i>d</i> et <i>y</i> (Le Bouvier et al, 1972), alors que Bancroft et al. observent les déterminants <i>w</i> et <i>r</i> (Bancroft et al, 1972). Le premier système de classification du virus apparaît déjà avec les quatre sous types majeurs <i>adw</i> , <i>ayw</i> , <i>adr</i> et <i>ayr</i> .
1973	ADN polymérase	Kaplan et al. démontrent la présence d'une activité ADN polymérase dans les capsides des particules de Dane (Kaplan et al, 1973).

1974	ADN viral	Robinson <i>et al.</i> découvrent que les capsides contiennent une petite molécule d'ADN circulaire double brin qui constitue le substrat de l'ADN polymérase (Robinson & Greenman, 1974).
1975	Structure ADNrc	Summers <i>et al.</i> proposent un modèle selon lequel, dans les particules virales, environ 20% de la molécule d'ADN serait sous une forme simple brin (Summers et al, 1975).
1976	Vaccin	Philippe Maupas <i>et al.</i> mettent au point chez l'homme le premier vaccin efficace contre le VHB (Maupas et al, 1976; Maupas et al, 1978).
1976	Interféron	Greenberg <i>et al.</i>, Desmyter <i>et al.</i> et Purcell <i>et al.</i> présentent des études selon lesquelles un traitement à base d'interféron permettrait de réduire la répllication du VHB chez les porteurs chroniques (Desmyter et al, 1976; Greenberg et al, 1976; Purcell et al, 1976).
1982	Transcriptase inverse	Summers <i>et al.</i> découvrent l'activité reverse transcriptase de la polymérase virale (Summers & Mason, 1982).
1982	Inhibiteur polymérase	Weller et al. démontrent l'effet inhibiteur de l'acyclovir, analogue nucléosidique, sur la répllication du VHB chez l'homme (Weller et al, 1982).
1988	Modèle d'infection	Gripon <i>et al.</i> mettent au point le premier modèle d'infection <i>in vitro</i> par le VHB (Gripon et al, 1993; Gripon et al, 1988).
2002	Lignée HepaRG	Gripon <i>et al.</i> identifient la première lignée hépatocytaire infectable par le VHB (Gripon et al, 2002).
2005	Inhibiteur d'entrée	Gripon <i>et al.</i> mettent au point un peptide inhibiteur de l'entrée virale <i>in vitro</i> (Gripon et al, 2005).
2008	Inhibiteur d'entrée	Peterson et al. démontrent l'efficacité du peptide inhibiteur de l'entrée virale <i>in vivo</i> (Petersen et al, 2008).

Tableau 1. Quelques grandes découvertes concernant le virus de l'hépatite B, de 1971 à aujourd'hui.

IV. Découverte et histoire du vaccin

En 1976, le premier vaccin testé chez l'homme efficace contre le virus de l'hépatite B est élaboré par l'équipe française de Philippe Maupas, qui a testé le vaccin sur l'équipe d'hémodialyse du CHU de Tours après se l'être eux même injecté (Maupas et al, 1976; Maupas et al, 1978). L'institut Pasteur est alors chargé de développer le vaccin pour une utilisation à grande échelle et obtient l'autorisation de mise sur le marché du «Hevac B » en 1981 (Sebton, 2004). Par la suite, de nombreux vaccins se sont succédés, le premier basé sur l'utilisation de protéines recombinantes de l'enveloppe virale, « Engerix B », fut développé par SmithKline Beecham en 1985 et mis sur le marché en 1989, il fut rapidement en compétition avec d'autres vaccins développés par les laboratoires Merck et l'Institut Pasteur (Sebton, 2004).

L'organisation mondiale de la santé (OMS) a alors lancé, en 1991, une campagne mondiale d'éradication de l'hépatite B (programme élargi de vaccination de 1991) (WHO, 1991; WHO, 1993). Ainsi, en France, depuis la vague extraordinaire de vaccination du milieu des années 90 jusqu'en 2001, plus de 29 millions de personnes ont été vaccinées (AFSSAPS, 2002). Pourtant, si depuis leur mise en place, les programmes de vaccination dans le monde n'ont pas été interrompus compte tenu de la remarquable efficacité du vaccin sur la prévalence de la

maladie [A Taiwan par exemple, après 20 ans de vaccination, le taux de porteurs chroniques chez les enfants est passé de 10% en 1984 à moins de 1% en 2004 (Chien et al, 2006; Ni et al, 2007); aux Etats Unis, l'incidence des hépatites aiguës rapportées a chuté de 82% entre 1990 et 2007 (Daniels et al, 2009)], la France fait aujourd'hui figure d'exception puisque que le 1^{er} octobre 1998, le ministre de la santé Bernard Kouchner, suspendait la vaccination effectuée par les médecins scolaires dans les collèges, en désaccord avec plusieurs associations de médecins et l'OMS (Calès, 2001). Cette décision survenait après la publication de deux bulletins d'alerte par l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (Afssaps) en mars 1995 concernant les effets indésirables neurologiques des vaccins anti-hépatite B. Plusieurs études de pharmacovigilance ont alors été menées, et en 2002, l'Afssaps publiait un communiqué de presse dans lequel elle concluait sur l'absence de corrélation démontrée entre la vaccination et le développement d'affections démyélinisantes (AFSSAPS, 2002):

« Ainsi, les conclusions de l'évaluation par l'Afssaps des données, issues de la notification spontanée et des études épidémiologiques, ont constamment fait apparaître que les résultats ne démontrent pas l'existence d'un risque de survenue d'affection démyélinisante associé à la vaccination contre l'hépatite B, et qu'ils permettent de conclure à l'absence d'un risque important, sans toutefois permettre d'exclure la possibilité d'un risque faible ».

De la même façon, l'OMS, après l'analyse de l'ensemble des études réalisées sur les risques potentiels du vaccin n'a jamais remis en cause la campagne de vaccination entreprise en 1991 (WHO, 2004), et l'institut national de veille sanitaire (INVS) publiait le 20 avril 2009 dans son bulletin épidémiologique hebdomadaire sa recommandation concernant la vaccination des nourrissons et des adolescents (INVS, 2009) :

« Le Haut conseil de la santé publique et le Comité technique des vaccinations recommandent que la vaccination contre l'hépatite B continue de s'appliquer en priorité à tous les nourrissons. Il recommande aussi que le rattrapage de la vaccination contre l'hépatite B soit poursuivi chez les enfants et les adolescents jusqu'à l'âge de 15 ans révolus. Tout enfant ou adolescent âgé de moins de 16 ans, non antérieurement vacciné, devrait se voir proposer la vaccination contre l'hépatite B à l'occasion d'une consultation médicale ou de prévention. »

Malgré la prise de décision claire en faveur du vaccin de tous les organismes de santé (AFSSAPS, 2002; AFSSAPS et al, 2004; INVS, 2009; WHO, 2008), et une polémique uniquement en France, le doute subsiste aujourd'hui au sein de la population française qui refuse encore souvent la vaccination. Quelles seront les conséquences de ces dix années (1998-aujourd'hui) de faible vaccination du nourrisson sur la prévalence de la maladie en France dans les prochaines années ?

Pour la prise en charge des malades non vaccinés et infectés chroniquement par le virus, les traitements à base d'interféron ont été mis en place rapidement. En effet, dès 1976, Greenberg *et al*, Desmyter *et al* et Purcell *et al* ont présenté des études selon lesquelles un protocole utilisant de l'interféron permettrait de réduire la réplication du VHB chez les porteurs chroniques (Desmyter *et al*, 1976; Greenberg *et al*, 1976; Purcell *et al*, 1976). C'est seulement quelques années plus tard que les inhibiteurs de la polymérase virale sont apparus (Hantz *et al*, 1984; Hirota *et al*, 1987; Lofgren *et al*, 1989; Nordenfelt *et al*, 1987; Tao *et al*, 1988), après la découverte de son activité reverse transcriptase par Summers *et al* en 1982 (Summers & Mason, 1982). Depuis, ces deux types de traitement sont toujours utilisés, indépendamment l'un de l'autre, pour traiter les malades souffrant d'hépatites chroniques (EASL, 2009).

V. Découvertes récentes

En 2002, la découverte de la première lignée hépatocytaire infectable par le VHB a permis de faciliter l'étude des déterminants viraux impliqués dans l'étape d'infection (Gripon *et al*, 2002). En effet, avant la découverte de cette lignée, le seul modèle d'infection *in vitro* disponible, mis au point en 1988 et amélioré en 1993, consistait en l'utilisation d'hépatocytes humains cultivés en culture primaire auxquels l'accès était souvent difficile (Gripon *et al*, 1993; Gripon *et al*, 1988). Grâce à ce nouveau modèle, en 2005, un travail réalisé au sein de notre laboratoire en collaboration avec Stephan Urban (Université de Heidelberg en Allemagne) a permis la découverte d'un peptide inhibiteur de l'infection *in vitro* correspondant à l'extrémité N-terminale de la grande protéine de l'enveloppe virale (Gripon *et al*, 2005). En 2008, l'efficacité prometteuse de cet inhibiteur de l'entrée virale a été démontrée *in vivo* sur des souris possédant un foie humanisé (Petersen *et al*, 2008).

En conclusion, il aura fallu attendre plus d'une cinquantaine d'années pour que les premiers cas de jaunisses sériques observés à la fin du XIX^{ème} siècle soient attribués à la présence d'un agent infectieux transmis par le sérum de patients infectés (fin de la seconde guerre mondiale) ; puis, une vingtaine d'années supplémentaires pour que le virus responsable de la maladie soit observé en 1970, avant d'assister à l'enchaînement des découvertes qui ont permis de caractériser la structure et les différentes étapes du cycle viral. La forte prévalence de la maladie dans le monde ainsi que la compréhension incomplète de la pathogenèse associée au virus ou de certaines étapes du cycle viral, telles que l'étape d'entrée, expliquent les nombreuses recherches menées actuellement sur le VHB. En effet, malgré toutes les avancées de la recherche, l'existence d'un vaccin efficace et de traitements antiviraux puissants, le nombre de personnes chroniquement infectées par le VHB dans le monde demeure extrêmement élevé.

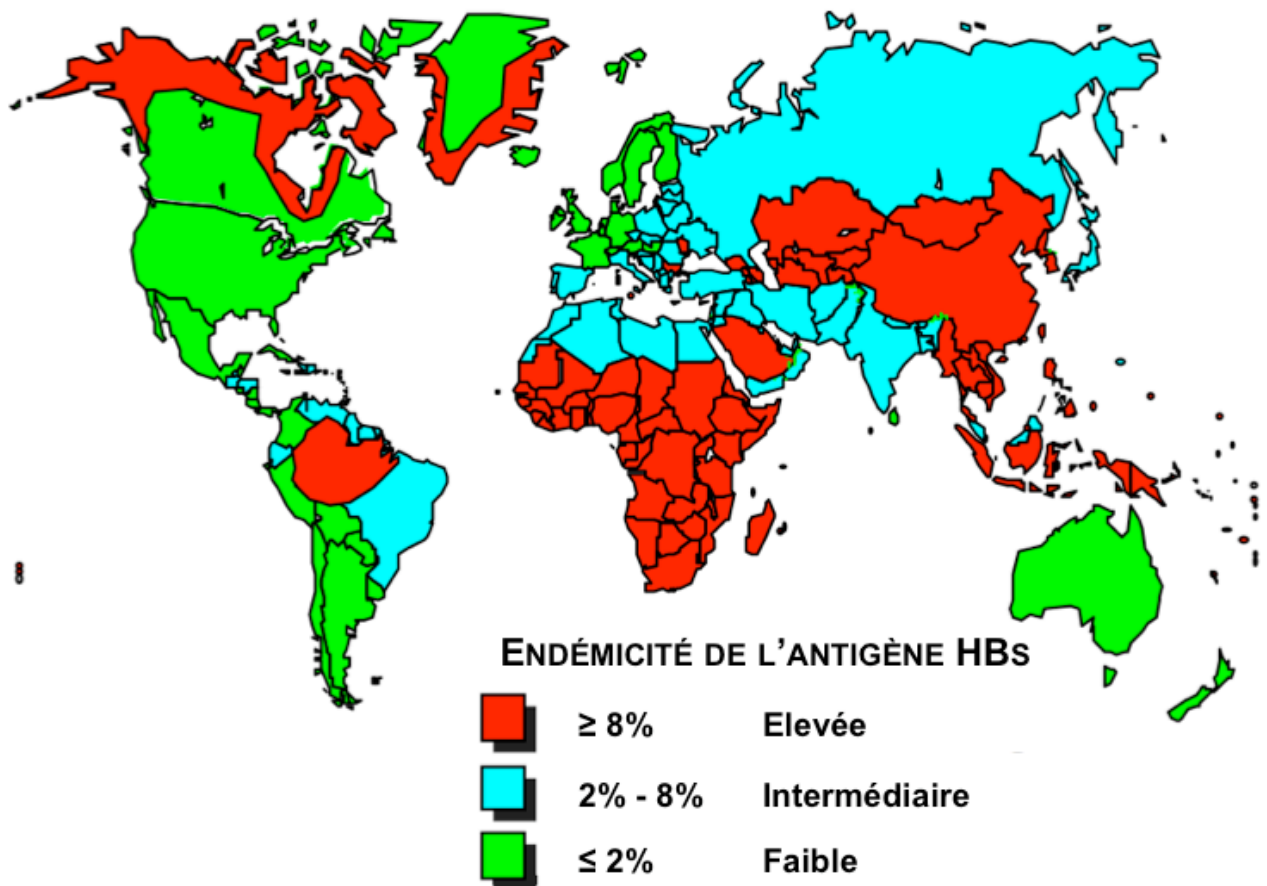


Figure 1. Distribution géographique des infections chroniques par le virus de l'hépatite B. (source : « World health organisation. Introduction of hepatitis B vaccine into childhood immunization services, 2001, Geneva, WHO, WHO/V&B/01.31 »).

CARACTERISTIQUES CLINIQUES DU VHB

I. Prévalence de l'infection par le VHB

A. *Dans le monde*

L'hépatite B est une maladie infectieuse grave, extrêmement contagieuse, qui provoquerait plus de 600 000 décès par an dans le monde (Goldstein et al, 2005). On estime à 2 milliards le nombre de personnes touchées par cette maladie, dont plus de 350 millions sont des porteurs chroniques capables de transmettre le virus pendant des années (WHO, 2002). Entre 15 et 40 % de ces derniers développent des complications hépatiques de type cirrhose, lésion du foie et hépatocarcinome (Lavanchy, 2004; Lok, 2002), ce dernier constituant le cinquième cancer le plus fréquent dans le monde (Parkin et al, 2001). Le virus présent dans de nombreux fluides corporels tels que le sang, la salive, le sperme et la sueur des individus infectés (Lavanchy, 2004; WHO, 2002; WHO, 2008) est facilement transmis par contact avec ces fluides et est 50 à 100 fois plus infectieux que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (WHO, 2008).

Environ 45% de la population mondiale vit dans des régions telles que l'Asie du sud-est ou l'Afrique sub-Saharienne où le niveau d'infection par le VHB est élevé (Fig. 1) (Mahoney, 1999). Dans ces régions de forte endémie, entre 70 et 90% de la population devient infectée avant l'âge de 40 ans et 8 à 20% des personnes sont des porteurs chroniques du virus (WHO, 2002). La plupart des infections résultent d'une transmission de la mère à l'enfant au moment de la naissance ou de contacts rapprochés entre les jeunes enfants (WHO, 2002). Dans les régions où le risque d'infection est modéré, dans lesquelles on recense entre 2 et 7% de porteurs chroniques, on recense 43% de la population mondiale. Enfin, les zones de faible endémicité telles que l'Europe occidentale ou les Etats-Unis, où la quantité de porteurs chroniques est inférieure à 2%, abritent 12% de la population mondiale (Mahoney, 1999). Dans ces régions, l'incidence la plus élevée de la maladie est retrouvée chez les adolescents et les jeunes adultes. Malgré le faible nombre de personnes infectées, certains groupes d'individus ayant une activité sexuelle à risque ou étant souvent en contact avec des produits sanguins présentent un niveau élevé d'infection, compte tenu de l'importante contagiosité du VHB dont la quantité de particules virales est extrêmement importante dans les fluides corporels tels que le sang ou le sperme.

B. *En France*

Une enquête permettant d'évaluer la prévalence de l'hépatite B en France métropolitaine a été menée en 2004 par l'INVS (INVS, 2007). L'enquête incluant 14 416 sujets a permis d'estimer que 0,65% de la population, soit environ 280 000 personnes étaient infectées

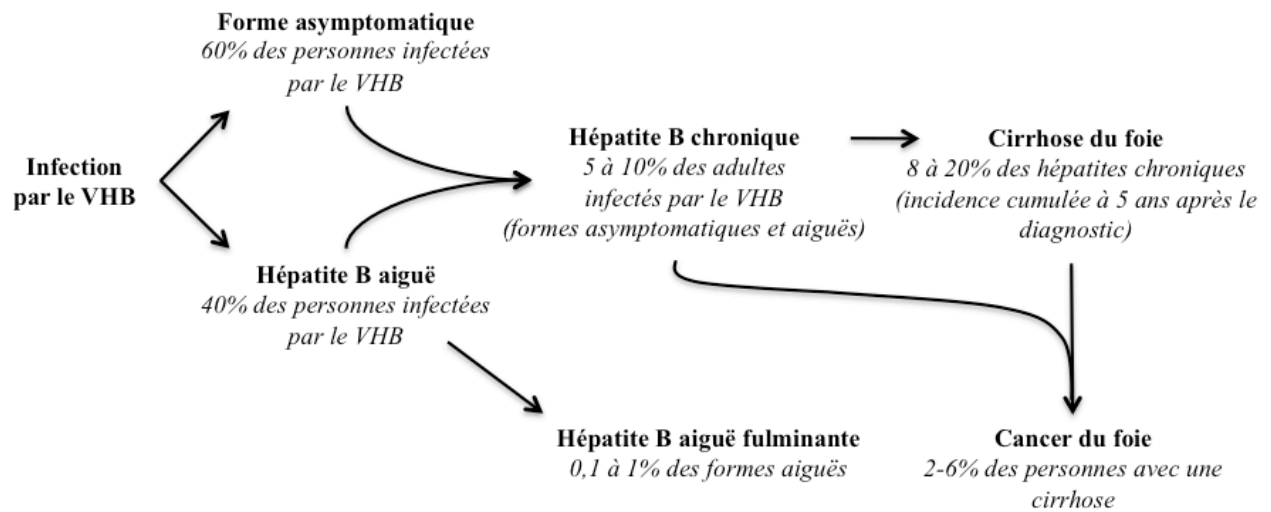


Figure 2. Manifestations cliniques d’une infection par le VHB (INVS, 2004; Liaw & Chu, 2009).

chroniquement par le VHB et que plus de 3 millions de français avaient été en contact avec le virus. Parmi ces personnes, 45% seulement étaient conscientes de leur infection. Cette étude a également permis de démontrer que la prévalence de la maladie variait selon l'âge passant de 10-12% chez les personnes de 45 à 60 ans à 3% chez les personnes de 18 à 24 ans. Par ailleurs, certains facteurs souvent liés à la classe sociale des individus, tels que l'usage de drogues par voie injectable ou un niveau d'étude inférieur au baccalauréat, ont été associés avec un risque d'infection plus élevé.

II. Aspects cliniques de l'infection par le VHB

A. Transmission

L'hépatite B se transmet par voie parentérale via une exposition percutanée ou muqueuse à des fluides biologiques infectés tels que le sang ou les sécrétions sexuelles. La contagiosité élevée du VHB est liée d'une part à sa présence en grande quantité dans la plupart des liquides biologiques des sujets infectés et d'autre part à la stabilité des particules virales pouvant rester infectieuses jusqu'à sept jours dans l'environnement (WHO, 2008). Dans les régions de forte endémie, la transmission s'effectue le plus souvent par voie verticale (de la mère à l'enfant, en Asie principalement) mais aussi de façon horizontale (d'enfant à enfant, en Afrique Noire principalement). La dissémination intrafamiliale du virus est le plus souvent aggravée par les mauvaises conditions d'hygiène et la promiscuité importante. Dans les régions d'endémie intermédiaire, la transmission est surtout horizontale (le grand enfant, l'adolescent et l'adulte jeune). Enfin, dans les pays occidentaux, l'infection virale n'est pas endémique et se transmet principalement par les rapports sexuels et les toxicomanies (INVS, 2007; Liaw & Chu, 2009).

B. Manifestations cliniques

1. Les différentes évolutions d'une infection par le VHB

Les manifestations cliniques de l'infection sont très variées (Fig. 2) [pour revue, consulter les références (EASL, 2009; Liaw & Chu, 2009)]. Souvent, l'infection par le VHB passe inaperçue. En effet, dans les deux tiers des cas, la maladie demeure asymptomatique. Cependant, après une incubation de 45 à 180 jours, l'infection peut se manifester par le développement d'une hépatite aiguë dont les principaux symptômes sont la présence d'un ictère, la fatigue, une perte de l'appétit, des douleurs abdominales, des nausées, et des vomissements. Cette hépatite est caractérisée par une nécrose hépatique associée à un processus inflammatoire dépendant de cytokines de l'immunité innée et adaptative telles que le $TNF\alpha$, l' $IFN\alpha$ et l' $IFN\beta$. La lyse des hépatocytes peut être mise en évidence par le dosage des transaminases (ASAT, ALAT) dont la concentration augmente dans le sérum des patients. Dans de rares cas, à savoir pour environ 1 %

des formes aiguës, le virus provoque une hépatite fulminante associée à un taux de mortalité élevé en absence de transplantation hépatique. Celle-ci résulte d'une réponse immunitaire excessive qui élimine rapidement les virus et les hépatocytes infectés conduisant ainsi à la destruction presque totale du parenchyme hépatique.

La guérison de l'hépatite B survient chez plus de 90% des patients adultes. Cependant, de petites quantités d'ADN viral sont souvent retrouvées par PCR dans le sérum et dans les monocytes périphériques des personnes ayant été infectées plusieurs années après leur guérison, indiquant un état occulte de l'infection (Mulrooney-Cousins & Michalak, 2007). Ainsi, le virus peut toujours être transmis via une transplantation d'organe, et une réactivation de l'infection peut apparaître suite à la prise de traitements immunosuppresseurs ou de chimiothérapie. Par ailleurs, les personnes ayant été en contact avec le virus continuent de produire des anticorps quelques années après la primo-infection, les protégeant durablement contre un nouveau contact avec le virus.

Le risque de développer une hépatite chronique est fortement corrélé avec l'âge des patients au moment de l'infection. En effet, celle-ci persiste chez près de 90% des nourrissons infectés à la naissance, chez 20 à 30% des enfants infectés entre 1 et 5 ans, chez 6% de ceux infectés entre 5 et 15 ans et finalement elle ne s'installe que chez 1 à 5% des patients infectés à l'âge adulte. Cette évolution de la maladie semble imputable à la faiblesse du système immunitaire chez les jeunes enfants et chez certains adultes. En effet, il a été supposé que la reconnaissance des hépatocytes infectés par des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques du virus constituerait le mécanisme principal de contrôle de l'infection virale, bien que ce mécanisme soit également responsable des dommages hépatiques associés à l'infection. Chez les individus chroniquement infectés, la réponse immunitaire impliquant les lymphocytes T spécifiques du virus serait trop faible pour éliminer ce dernier mais serait suffisante pour induire une réponse inflammatoire persistante et inefficace. Etant donné que le VHB n'est pas cytopathogène, excepté dans certaines formes cliniques telles que les hépatites fibrosantes cholestatiques survenant chez des patients immunodéprimés, les différences de sévérité de l'hépatite B sont attribuées à des variations individuelles de la réponse immunitaire, les réponses humorales et cellulaires permettant d'éliminer les virus circulants et les cellules infectées, respectivement.

2. Les phases de l'infection chronique par le VHB

Le développement de la chronicité implique plusieurs phases, pas nécessairement séquentielles, résultant de l'interaction entre le virus, les hépatocytes et la réponse immunitaire (Fig. 3) [pour revue, consulter les références (EASL, 2009; Liaw & Chu, 2009)]. La première phase, dont la durée est d'autant plus longue que la contamination se fait tôt dans la vie, correspond à une phase de tolérance immune, la seconde, à une réponse immunitaire active

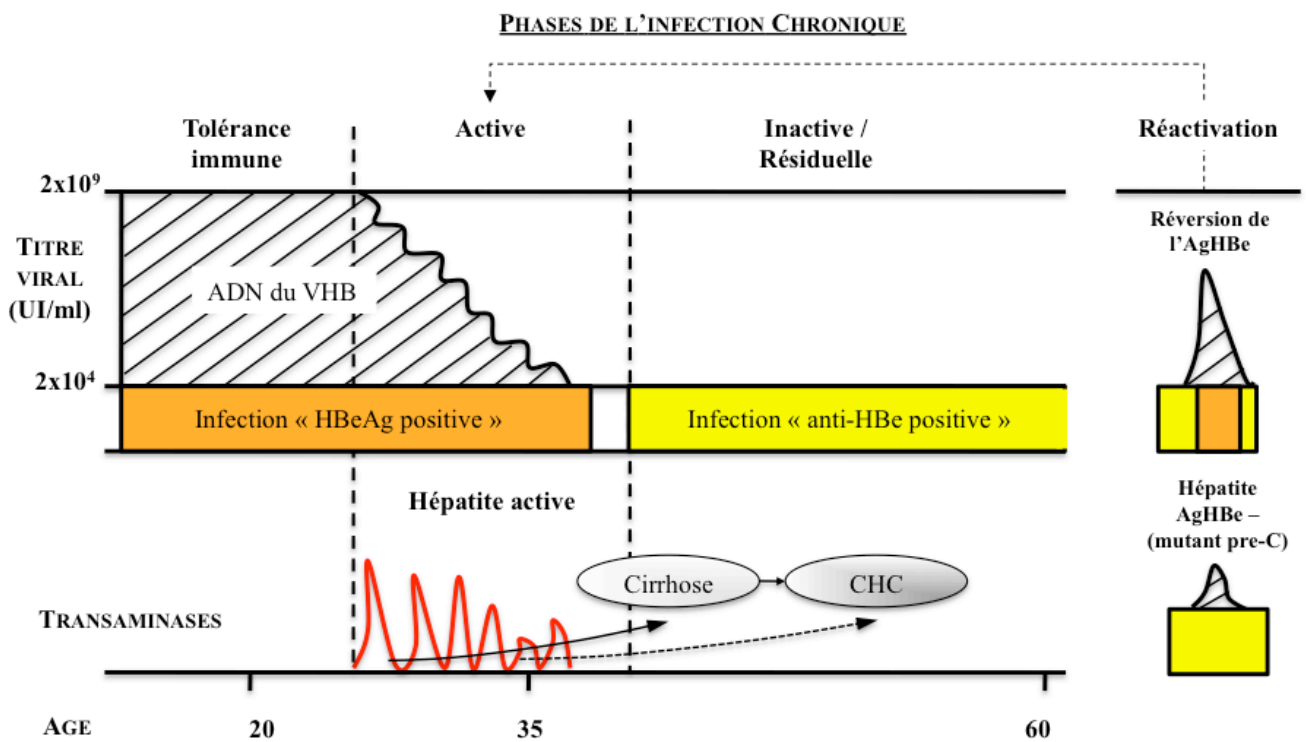


Figure 3. Schématisation des événements associés aux différentes phases d'une infection chronique par le VHB acquise pendant l'enfance. Lors d'une infection à l'âge adulte, la première phase de tolérance est quasi inexistante. (Source : revue générale parue dans « The Lancet » en 2009, « Hepatitis B virus infection » (Liaw & Chu, 2009)).

contre l'infection qui fait chuter la virémie et la troisième, faisant suite à une séroconversion HBe (HBe : antigène viral sécrété), à une infection résiduelle faiblement répliquative (charge virale $< 10^4$ copies/mL), au cours de laquelle des réactivations (signant l'émergence de virus mutants « AgHBe négatifs ») peuvent provoquer un retour dans la phase active. Enfin, la perte de l'AgHBs (antigène viral de surface), s'accompagne le plus souvent, d'un niveau d'ADN viral indétectable.

La phase de tolérance, qui concerne généralement des patients jeunes et asymptomatiques, est caractérisée par la présence d'AgHBe et par une charge virale élevée qui n'induit pas de souffrance hépatique comme en témoigne un niveau normal des transaminases. Durant cette phase, la virémie très élevée rend les malades extrêmement contagieux.

Durant la phase immunitaire active, toujours caractérisée par la présence d'AgHBe, la charge virale diminue et la progression de la fibrose augmente par rapport à la phase précédente. Cette phase peut perdurer pendant plusieurs années durant lesquelles le taux de perte spontanée de l'AgHBe est augmenté. C'est la phase où se constituent les lésions de fibrose et sa durée conditionne la gravité de la maladie hépatique. De façon importante, il a été démontré que le risque de développer une cirrhose et/ou un carcinome hépatocellulaire au cours d'une infection chronique par le VHB était proportionnel à la réplication virale et aux atteintes hépatiques provoquées par le système immunitaire lors des phases actives de la maladie. En effet, le processus inflammatoire induit en permanence des cycles de nécrose - régénération du tissu hépatique conduisant à la cirrhose du foie. Cette dernière se caractérise par une fibrose annulaire et par l'apparition de nodules de régénération qui augmentent le risque de survenue du cancer du foie. Toutefois, ce phénomène n'est pas responsable à lui seul des hépatocarcinomes liés au VHB (*cf.* chapitre suivant).

Après la phase immunitaire active, survient la phase dite inactive, ou résiduelle. Elle se manifeste après la séroconversion HBe, qui correspond à l'apparition d'anticorps dirigés contre l'AgHBe induisant la disparition de cet antigène. Elle est caractérisée par une charge virale faible, voire indétectable, du fait du contrôle immunitaire de l'infection.

Une des évolutions tardive et fréquente de la maladie, surtout dans certaines régions du monde telles que l'Europe, compte tenu du vieillissement des personnes infectées par le VHB, correspond à l'apparition d'une hépatite chronique dite négative pour l'AgHBe (75% des hépatites chroniques actives en France sont AgHBe négative). Cette dernière est due à l'apparition de virus mutants incapables de produire l'AgHBe à cause de mutations présentes dans le promoteur, ou le gène, permettant l'expression de cet antigène. Elle se caractérise par des poussées de réactivation périodique de la maladie traduites par des niveaux variables d'ADN viral et de transaminases hépatiques. Il est important d'individualiser cette forme clinique de la

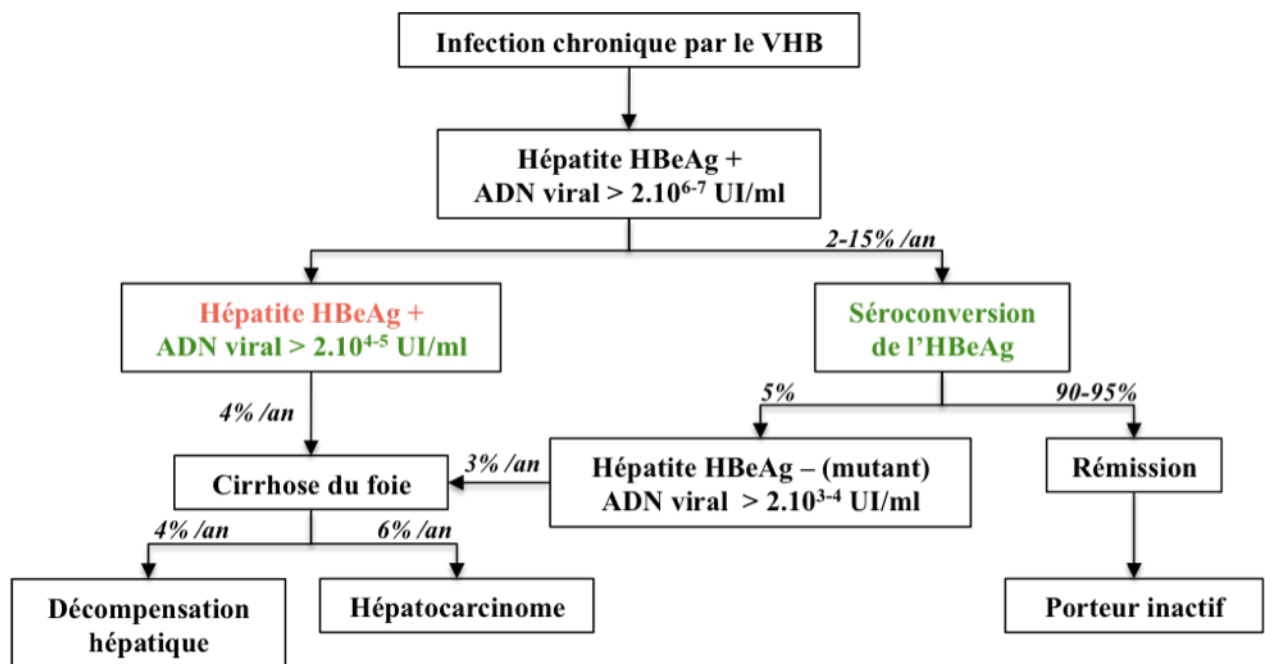


Figure 4. Schéma simplifié des évolutions possibles d'une infection chronique par le VHB. (Source : revue générale parue dans « The Lancet » en 2009, « Hepatitis B virus infection » (Liaw & Chu, 2009)).

maladie car elle est associée à un très faible taux de rémission spontanée et prolongée (Fig. 4) et touche souvent des malades au stade de cirrhose. Pour cela, un suivi attentif des patients est nécessaire au cours duquel la charge virale et le niveau des transaminases doivent être régulièrement contrôlés.

Enfin, la dernière phase de l'hépatite chronique correspond à la disparition de l'AgHBs. Elle s'accompagne le plus souvent de niveaux indétectables d'ADN viral et de la présence, ou non, d'anticorps dirigés contre l'AgHBs. Elle est associée à un arrêt souvent définitif de la réplication virale. Il n'y a donc habituellement plus de risque d'aggravation de la maladie et le pronostic dépend du stade de la fibrose lorsque survient cet événement. La principale préoccupation concernant les patients dans cette phase est la survenue d'une réactivation en cas d'immunosuppression.

3. VHB et carcinome hépatocellulaire

Le carcinome hépatocellulaire (CHC), avec une incidence estimée à plus de 500 000 cas en l'an 2000, est le cinquième cancer le plus fréquent au monde (El-Serag, 2004; Llovet et al, 2003; Parkin et al, 2001; Shibuya et al, 2002). De plus, il constitue la troisième cause de mort par cancer derrière les cancers du poumon et de l'estomac, notamment à cause de sa forte résistance aux traitements. La distribution géographique variable des CHC a permis d'identifier l'infection chronique par le VHB comme la cause majeure de ce cancer (Ahn et al, 2005; Evans et al, 1998; Montalto et al, 2002; Pollicino et al, 2004). Ainsi il a été estimé que plus de 50% des cas d'hépatocarcinome dans le monde pouvait être associé au VHB (Parkin et al, 2001). Par ailleurs, les patients porteurs du virus ont 25 à 37 fois plus de risque de développer un CHC comparé aux personnes non infectées (Hassan et al, 2002; Yang et al, 2002), ce risque étant proportionnel à la charge virale (Iloeje et al, 2006). De nombreuses études ayant cherché à comprendre la relation entre l'infection par le VHB et le développement de CHC ont permis de mettre en évidence des liens, directs ou indirects, entre les deux pathologies [pour revue, consulter la référence (Lupberger & Hildt, 2007)].

a. Effet direct de l'intégration du génome viral

Bien que l'intégration du génome viral ne soit pas nécessaire à la réplication du VHB, quasiment tous les cas de CHC associés au virus présentent une insertion de l'ADN viral dans un chromosome cellulaire (Beasley et al, 1981; Brechot et al, 1980; Brechot et al, 2003). Celle-ci se caractérise dans la plupart des cas par des réarrangements tels que des délétions tant dans le génome viral qu'au niveau du site chromosomique d'intégration (Thorgeirsson & Grisham, 2002). Cependant, il semble que l'insertion site spécifique du génome viral dans des oncogènes soit un événement rare ne pouvant expliquer le lien étroit entre la survenue du cancer et

l'infection bien que quelques exemples aient été documentés.

b. Effets indirects de l'intégration du génome viral

- Rôle de la protéine HBx :

Dans la plupart des génomes viraux intégrés, le gène de la protéine X est conservé et transcrit (Schluter et al, 1994). La protéine X, petite protéine régulatrice conservée parmi les hepadnavirus (famille de virus à laquelle appartient le VHB), a été décrite comme un activateur transcriptionnel (Twu & Schloemer, 1987; Wollersheim et al, 1988). Sa localisation subcellulaire variable, soit au niveau du cytoplasme, soit au niveau du noyau serait associée à ses différentes fonctions (Hafner et al, 2003; Sirma et al, 1998). Dans le cytoplasme, elle permettrait la régulation d'un grand nombre de gènes en interagissant avec des cascades de signalisation, en amont des complexes de transcription, permettant l'activation de facteurs de transcription tels que AP-1, NF- κ B, SP1 et oct-1 (Waris & Siddiqui, 2003; Zhang et al, 2006). Dans le noyau, elle pourrait interférer directement avec certains facteurs de transcription ou encore jouer un rôle de facteur de transcription. De plus, il a été démontré que la protéine X perturberait les mécanismes de réparation de l'ADN, augmentant ainsi le risque d'apparition de mutations impliquées dans la carcinogenèse. Cependant, l'analyse de la fréquence de mutation dans des souris transgéniques exprimant la protéine X est en désaccord avec cette hypothèse (Madden et al, 2000). Enfin, des données supportent l'hypothèse selon laquelle la protéine X interagirait directement avec le suppresseur de tumeur p53 et serait capable d'induire sa répression transcriptionnelle (Tang et al, 2006). Néanmoins, la pertinence physiologique de ces résultats doit encore être démontrée compte tenu de l'important excès de la protéine p53 par rapport à la protéine X dans les hépatocytes. Quoiqu'il en soit, la protéine X affecte l'expression d'un grand nombre de gènes cellulaires impliqués dans des mécanismes tels que la prolifération cellulaire et l'apoptose, suggérant fortement son implication dans la carcinogenèse associée à l'infection par le VHB (Chan & Sung, 2006; Cougot et al, 2005; Koike et al, 2002; Staib et al, 2003).

- Rôle des protéines « Pre-S2 activatrices » :

Comme pour la protéine X, dans la plupart des génomes viraux intégrés, le cadre de lecture des protéines Pre-S2 activatrices est conservé et transcrit. Ces protéines sont produites par des gènes des protéines d'enveloppe tronqués en 3' (Schluter et al, 1994). Elles correspondent à la protéine de surface M (*cf.* chapitre « L'enveloppe virale », page 33) délétée d'une partie C-terminale de plus ou moins grande taille, la plus grande délétion aboutissant à la production du domaine Pre-S2 (N-terminal) uniquement. Ainsi, il existe deux types de protéines régulatrices, celles insérées dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) via les deux premiers domaines transmembranaires de la région S des protéines d'enveloppe (Hildt et al, 1993; Meyer et al, 1992) et les protéines régulatrices cytoplasmiques qui ont perdu leurs domaines

transmembranaires (Hildt et al, 1996b; Lauer et al, 1992). L'analyse des protéines M tronquées membranaires a mis en évidence plusieurs différences entre elles et leur équivalent non tronqué dans l'enveloppe virale : (i) elles ne sont pas sécrétées et restent associées aux membranes du RE (Hildt et al, 1993), (ii) elles ne sont pas glycosylées sur le quatrième résidu du domaine Pre-S2 (Hildt et al, 1993), (iii) leur domaine Pre-S2 est exposé du côté cytoplasmique de la membrane du RE et peut interagir avec des partenaires cytoplasmiques impliqués dans des voies de signalisation (Hildt et al, 1995). A ce jour, aucune différence de fonction entre les formes membranaires et cytoplasmiques des protéines Pre-S2 régulatrices, n'a été mise en évidence (Hildt et al, 1995). La grande protéine d'enveloppe, L, possédant elle aussi un domaine Pre-S2 pouvant être orienté du côté cytoplasmique du RE, appartient également à la famille des protéines Pre-S2 activatrices (Hildt et al, 1996a).

Les protéines de cette famille sont capables d'interagir avec la protéine kinase C, phosphorylant le domaine Pre-S2, et d'activer des voies de transduction impliquant les kinases c-raf-1, MEK et ERK impliquées dans le contrôle de la prolifération cellulaire (Hildt et al, 2002). L'activation de ce type de voie pourrait jouer un rôle important dans la carcinogenèse. En effet, des souris transgéniques exprimant une protéine M tronquée régulatrice et développant des cancers du foie à l'âge de 10 mois environ présentent une activation permanente des voies de transduction impliquant les kinases précédentes. Bien que des tumeurs se développent de la même manière dans des souris transgéniques exprimant la protéine d'enveloppe L, il semble que dans ces cas le facteur essentiel impliqué dans la carcinogenèse résulte de l'activité inflammatoire permanente provoquée par la surexpression et l'accumulation forte de la protéine L dans les hépatocytes (Chisari, 2000; Chisari et al, 1989; Dunsford et al, 1990), alors appelés « hépatocytes en verre dépoli » ou plus communément en anglais « ground glass hepatocytes ». Toutefois, un rôle direct dans la carcinogenèse peut être attribué aux protéines Pre-S2 activatrices via l'activation de voies de transductions impliquées dans la prolifération des hépatocytes.

- Rôle de la réponse immunitaire :

Malgré le rôle important des protéines régulatrices X ou Pre-S2, il est probable que le système immunitaire joue un rôle majeur dans le développement des CHC associés au VHB (Chisari, 2000; Rehmann, 2003; Rehmann & Nascimbeni, 2005). En effet, des études ont montré que l'inflammation chronique du tissu hépatique provoquée par le système immunitaire augmentait le risque de cancer en induisant une forte mortalité cellulaire et donc une forte prolifération des hépatocytes (Chisari, 2000; Chisari et al, 1985; Ferrari et al, 2003; Visvanathan & Lewin, 2006). Ainsi, la qualité de la réponse immunitaire serait non seulement impliquée dans le développement de la chronicité mais serait également un facteur majeur impliqué dans la

carcinogénèse lors d'une hépatite chronique.

III. Traitement de l'infection chronique par le VHB

Malgré l'existence d'un vaccin efficace, de nombreuses personnes dans le monde n'ayant pu être vaccinées ont été infectées chroniquement par le VHB. Différents traitements, consistant schématiquement en l'utilisation d'interférons ou d'inhibiteurs de la polymérase virale, peuvent être utilisés pour traiter ces personnes lorsqu'elles développent une hépatite [pour revue, consulter les références (EASL, 2009; Lok & McMahon, 2007)].

La première étape nécessaire à la mise en place d'un traitement adapté et efficace consiste à vérifier la relation de cause à effet entre les symptômes observés d'une part et la présence d'une infection par le VHB d'autre part. La recherche de marqueurs viraux, tels que l'ADN viral, permet d'identifier l'agent responsable de l'hépatite et éventuellement de détecter la présence d'une co-infection par un autre virus tel que le virus de l'hépatite C (VHC), le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou le virus de l'hépatite delta (VHD). De plus, la mesure du titre viral est primordiale pour la prise de décision thérapeutique, et également pour le suivi de l'évolution de la maladie. La deuxième étape consiste à évaluer l'activité de la maladie qui se traduit par une cytolyse (élévation des taux sériques des transaminases ALAT et ASAT), reflet de l'intensité de la nécrose hépatocytaire. La biopsie hépatique permet d'évaluer le stade de fibrose ainsi que le niveau de l'activité nécro inflammatoire. Il y a un grand intérêt pour le développement de techniques non invasives d'évaluation de la fibrose telles que l'élastométrie impulsionnelle (Fibroscan) et les tests sériques (Fibromètre® ou Fibrotest®). Schématiquement, la combinaison des données précédentes, à savoir (i) le niveau sérique d'ADN viral, (ii) le niveau sérique des transaminases et (iii) le stade de la fibrose ainsi que le grade de l'activité nécro inflammatoire, permet au clinicien de décider de la nécessité de la mise en place d'un traitement. Si tel est le cas, ces facteurs ainsi que l'âge du patient, son état de santé général ou encore le génotype par lequel il a été infecté orienteront le choix du traitement.

Quel que soit le traitement, le but de la thérapie est d'améliorer la qualité de vie ainsi que la survie des personnes infectées en empêchant la progression de la maladie. Pour cela, les médicaments administrés doivent réduire au maximum le niveau d'ADN viral afin qu'il soit idéalement indétectable. En effet, il a été démontré que la réduction de la charge virale induite par une thérapie était associée à une rémission de la maladie. De plus, un faible niveau d'ADN viral prévient la survenue de résistances et favorise la séroconversion HBe ainsi que la perte de l'AgHBs, ces deux événements constituant l'objectif ultime des thérapies.

A. Thérapies à base d'interféron

Les interférons sont des molécules immunomodulatrices dont l'efficacité, après 4 à 12

mois de traitement, est de 30-40% chez des patients chroniquement infectés par un virus sauvage AgHBe positif. Son efficacité est également bonne en cas d'hépatite à virus « mutant pré-C » AgHBe négatif, mais dans ce dernier cas, les rechutes après traitement sont fréquentes. Le génotype du virus influence la réponse aux interférons. En effet, les patients porteurs du génotype A, par rapport au D, ou les patients porteurs du génotype B, par rapport au C répondent mieux au traitement. Ce type de thérapie est indiqué chez les patients, généralement jeunes, présentant une infection du foie compensée, un génotype favorable (A ou B), une virémie faible et un taux de transaminases élevé. Le suivi des patients traités a permis de démontrer que les thérapies à base d'interféron étaient bénéfiques à long terme en permettant : (i) d'augmenter les taux de séroconversion HBe et HBs, (ii) de diminuer la fréquence de survenue de la cirrhose et du carcinome hépatocellulaire, et (iii) d'augmenter la survie des répondeurs. Un avantage important de ce type de thérapie consiste en la durée définie du traitement et en l'absence de résistance. Cependant, de nombreux effets secondaires peuvent être observés tels qu'un syndrome pseudo grippal, de la fatigue, un syndrome dépressif, une anorexie, une perte de poids, une thyroïdite et un retentissement hématologique (leucopénie ou thrombopénie) pouvant conduire à l'arrêt du traitement ou à une diminution des doses. La tolérance en est difficile en cas de cirrhose décompensée qui constitue une contre indication à son emploi.

B. Inhibiteurs de la polymérase virale

Ces antiviraux, à savoir la lamivudine, l'adefovir, l'entecavir, la telbivudine et le tenofovir, cités par ordre de leur apparition sur le marché pour traiter le VHB, correspondent à des analogues de nucléotides ou de nucléosides ayant une grande affinité pour la polymérase virale. Leur action inhibitrice passe par leur incorporation dans la molécule d'ADN viral afin de bloquer son élongation. Ils ont l'avantage d'être rapidement efficaces pour inhiber la réplication virale, d'être bien tolérés et peuvent être administrés par voie orale. Ils sont donc préférés chez les patients présentant une décompensation hépatique et devant être traités efficacement le plus rapidement possible. L'association de l'interféron à la lamivudine n'augmente pas l'efficacité du traitement. L'association aux autres antiviraux reste une voie thérapeutique à évaluer. Il n'y a pas de corrélation entre la puissance du traitement (contrôle de la charge virale B) et la survenue de séroconversion HBe (15-20% des cas) qui, seule, permet d'espérer une efficacité durable à l'arrêt du traitement. Il s'agit donc le plus souvent de traitements au long cours avec le risque d'émergence de mutations de résistance dans le gène de la polymérase conduisant à un échappement thérapeutique (remontée de la charge virale de plus de 1 log sous traitement). Cependant, les nouvelles molécules, telles que l'entecavir et le tenofovir, ont un bon profil de résistance avec un recul de 2 ans. De plus, il est possible de combiner les antiviraux ne

présentant pas de résistances croisées, pour bloquer la réplication des virus résistants.

BIOLOGIE DU VHB

VIRUS APPARENTES ET SATELLITES

I. Famille des hepadnaviridae

Le virus de l'hépatite B appartient à une famille de virus nommée *hepadnaviridae*, pour virus hépatotropes à ADN. Ces virus apparentés infectent les oiseaux (genre des avihepadnavirus) et les mammifères (genre des orthohepadnavirus). Après le clonage et le séquençage du génome du VHB (Galibert et al, 1979), le premier hepadnavirus non humain a été mis en évidence chez les marmottes (WHV pour Woodchuck Hepatitis Virus) (Summers et al, 1978). Il a été découvert dans le sérum d'animaux élevés en captivité, souffrant d'hépatite chronique et pouvant développer des carcinomes hépatocellulaires. Ultérieurement, toute une série de virus homologues, présentée dans le tableau 2 a été découverte. Les virus isolés chez les primates étant regroupés à proximité des différents génotypes du virus humain sur les arbres phylogénétiques (Fig. 5), la nomenclature HBVcpz, HBVgbn et HBVoru, du même type que celle utilisée pour les virus apparentés au VIH (virus de l'immunodéficience humaine) a été utilisée (Schaefer, 2007).

VIRUS	ABREVIATION	HOTE	REFERENCE
ORTHOHEPADNAVIRUS			
Hepatitis B Virus	HBV	Homme	(Dane et al, 1970)
Chimpanzee Hepatitis B Virus	HBVcpz	Chimpanzé	(Vaudin et al, 1988)
Gibbon Hepatitis B Virus	HBVgbn	Gibbon à mains blanches	(Norder et al, 1996)
Orangutan Hepatitis B Virus	HBVoru	Orang-outan	(Warren et al, 1999)
Gorilla Hepatitis B Virus	HBVcpz	Gorille	(Grethe et al, 2000)
Wooly Monkey Hepatitis B Virus	WMHBV	Singe laineux	(Lanford et al, 1998)
Woodchuck Hepatitis Virus	WHV	Marmotte	(Summers et al, 1978)
Ground Squirrel Hepatitis Virus	GSHV	Ecureuil terrestre	(Marion et al, 1980)
Arctic Squirrel Hepatitis Virus	ASHV	Ecureuil terrestre arctique	(Testut et al, 1996)
AVIHEPADNAVIRUS			
Duck Hepatitis B Virus	DHBV	Canard domestique	(Mason et al, 1980)
Grey Teal Hepatitis B Virus	GTHBV	Sarcelle australienne	(Li et al, 1998)
Heron Hepatitis B Virus	HHBV	Héron	(Sprengel et al, 1988)
Maned Duck Hepatitis B Virus	MDHBV	Canard à crinière	(Li et al, 1998)
Ross Goose Hepatitis Virus	RGHV	Oie de Ross	(Naumann et al, 1993)
Snow Goose Hepatitis B Virus	SGHBV	Oie des neiges	(Chang et al, 1999)
Stork Hepatitis B Virus	STHBV	Cigogne blanche Grue demoiselle	(Pult et al, 1998)
Crane Hepatitis B Virus	CHBV	Grue royale	(Prassolov et al, 2003)

Tableau 2. La famille des hepadnaviridae et ses hôtes (Schaefer, 2007). Les génomes des virus infectant le chimpanzé et le gorille différant de moins de 5% l'un de l'autre, on parle d'un seul génotype, HBVcpz.

A. Caractéristiques communes des hepadnavirus

Les virus appartenant à la famille des hepadnaviridae possèdent de nombreux points communs tels que :

- (i) l'ultrastructure des particules virales : l'information génétique est encapsidée et enveloppée ; des particules subvirales, correspondant à des enveloppes vides, sont produites en grande quantité ;
- (ii) le génome est constitué d'une molécule d'ADN relaxée circulaire partiellement double brin dont la taille et l'organisation génétique sont peu variables ;
- (iii) le mode de répllication implique une étape de transcription inverse ;
- (iv) leur spécificité d'espèce est très étroite, par exemple, le VHB n'infecte que l'homme et les primates, et le DHBV n'infecte pas les oies.
- (v) le tropisme des virus est essentiellement hépatocellulaire.

Les hepadnavirus sont considérés comme des virus hépatotropiques bien que de l'ADN viral soit aussi retrouvé dans plusieurs tissus (Coffin & Michalak, 1999; Korba et al, 1990; Korba et al, 1988a; Korba et al, 1989a; Korba et al, 1989b; Korba et al, 1988b; Korba et al, 1987; Korba et al, 1986; Lew & Michalak, 2001; Michalak et al, 2004; Michalak et al, 1999; Mulrooney & Michalak, 2003). Les cibles extrahépatiques sont observées aussi bien pour les virus aviaires que pour le WHV et le VHB. Bien que ces données soient controversées (Kock et al, 1996b), il a été suggéré que le DHBV se répliquerait dans le tissu pancréatique des canards infectés, et que le VHB et le WHV seraient capables d'infecter des cellules du système lymphatique. Le rôle précis des infections extrahépatiques n'a pas encore été élucidé, mais elles constitueraient sans doute un "réservoir" pour le virus, ce qui expliquerait par exemple la réinfection fréquente du foie après une greffe.

B. Caractéristiques divergentes des hepadnavirus

1. Le groupe des avihepadnavirus

En dépit de leurs ressemblances, les hepadnaviridae sont différents sur quelques points. Les virus aviaires sont les plus divergents par rapport aux autres membres de la famille. Leurs génomes sont légèrement plus courts que ceux des virus de mammifères et ils présentent une faible homologie de séquence avec ces derniers (Mandart et al, 1984; Sprengel et al, 1985). Leur organisation génétique est également modifiée puisqu'ils ne codent que pour 2 protéines d'enveloppe (L et S) et ne comportent pas de gène X individualisé.

Globalement, les avihepadnavirus ne possèdent que 40% d'homologie de séquence avec le VHB (Schaefer, 2007). Cependant, le VHB et le DHBV, prototype des avihepadnavirus, partagent de nombreuses caractéristiques fondamentales. Les homologies entre les deux virus et

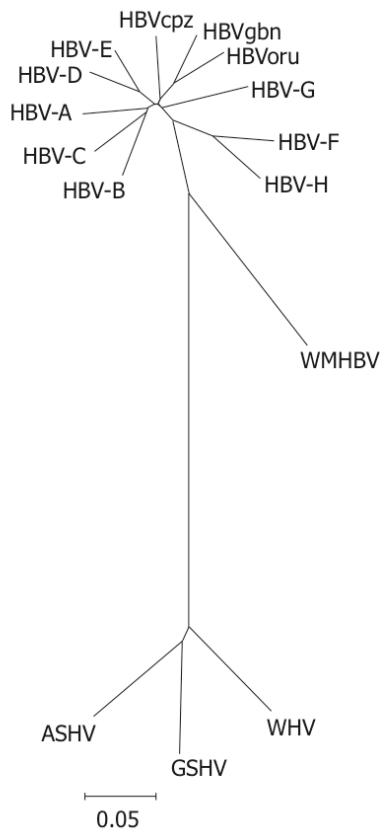


Figure 5. Arbre phylogénétique des orthohepadnavirus. L'alignement est réalisé avec « clustal w » entre les génomes complets des génotypes du VHB : A (X02763), B (D00330), C (M12906), D (V01460), E (X75657), F (X69798), G (AF160501), H (AY090454), VHBcpz (D00220), VHBoru (NC002168) et VHBgbn (U46935) et les génomes du WMHBV (AF046996), du WHV (J02442), du GSHV (K02715) et du ASHV (nc_001719). Source : (Schaefer, 2007).

la disponibilité, pour le DHBV, d'un modèle d'infection très efficace avec près de 100% des hépatocytes primaires de canard infectables *in vitro*, a rapidement conduit à l'utilisation du DHBV comme modèle de substitution pour l'étude de la biologie du VHB [pour revue, consulter les références (Funk et al, 2007; Glebe, 2007; Glebe & Urban, 2007)]. Néanmoins, les différences observées entre les deux virus, résumées dans le tableau 3, doivent être prises en considération lorsque l'on compare des données obtenues dans ces deux modèles.

DIFFERENCES OBSERVEES	DHBV	HBV
Transmission du virus	Principalement verticale	Verticale et horizontale
Développement d'hépatite	NON, ou très faible	OUI. Aiguë ou chronique
Induction de CHC	NON	OUI
Protéines d'enveloppe	L et S : non glycosylées L : phosphorylée	L, M et S : glycosylées Pas de phosphorylation
Protéine X	ORF cryptique « X-like »	Plusieurs rôles identifiés dans le cycle
Diamètre des virus	Virus complets : 55-60 nm Particules subvirales : 55-60 nm	Virus complets : 45 nm Particules subvirales : 22 nm
Ponts disulfures de l'enveloppe	Peu nombreux. Virus solubilisés par des détergents.	Nombreux. Virus résistants aux détergents.
Modèle d'infection	100% des hépatocytes en culture primaire peuvent être infectés.	Niveau d'infection très faible des hépatocytes en culture primaire.
Récepteur	Carboxypeptidase D (CPD)	La CPD n'est pas nécessaire à l'infection
Motif de translocation (TLM) du domaine Pre-S	Nécessaire à l'infectivité	Pas impliqué dans l'étape d'infection
Translocation du domaine Pre-S	Dépendante du TM1 et du TM2	Dépendante du TM2 de la protéine L
Entrée virale	Bloquée par la bafilomycine	Augmentée par la bafilomycine

Tableau 3. Principales différences observées entre les modèles du VHB et du DHBV (Glebe, 2007; Glebe & Urban, 2007).

2. Le groupe des orthohepadnavirus

A la différence des avihepadnavirus, les virus infectant les mammifères tels que le WHV ou le GSHV, ne diffèrent que de 17% du VHB, et ceux infectant les primates, très proches du virus humain, sont apparentés à des génotypes du VHB (Fig. 5) (Schaefer, 2007). Compte tenu de certaines limites inhérentes aux différences entre le DHBV et le VHB, le WHV, dont le mode de transmission est très similaire à celui du VHB, est un modèle de choix pour étudier la pathogenèse associée à l'infection par le virus humain. Cependant, il existe une différence importante entre le VHB et le WHV concernant l'évolution de la maladie puisque près de 100% des animaux chroniquement infectés par le WHV développent un CHC ainsi que 20% de ceux ayant guéri d'une hépatite aiguë. Ceci est en étroite corrélation avec le fait que le WHV semble être le seul virus à posséder un site préférentiel d'intégration dans l'ADN de la cellule hôte (Fourel et al, 1994; Fourel et al, 1990; Hsu et al, 1988; Wei et al, 1992). Néanmoins, le WHV est un excellent modèle pour l'étude préclinique de nouvelles molécules antivirales ainsi que pour l'analyse de la réponse immunitaire associée à l'infection [pour revue, consulter les références (Glebe, 2007; Menne & Cote, 2007)].

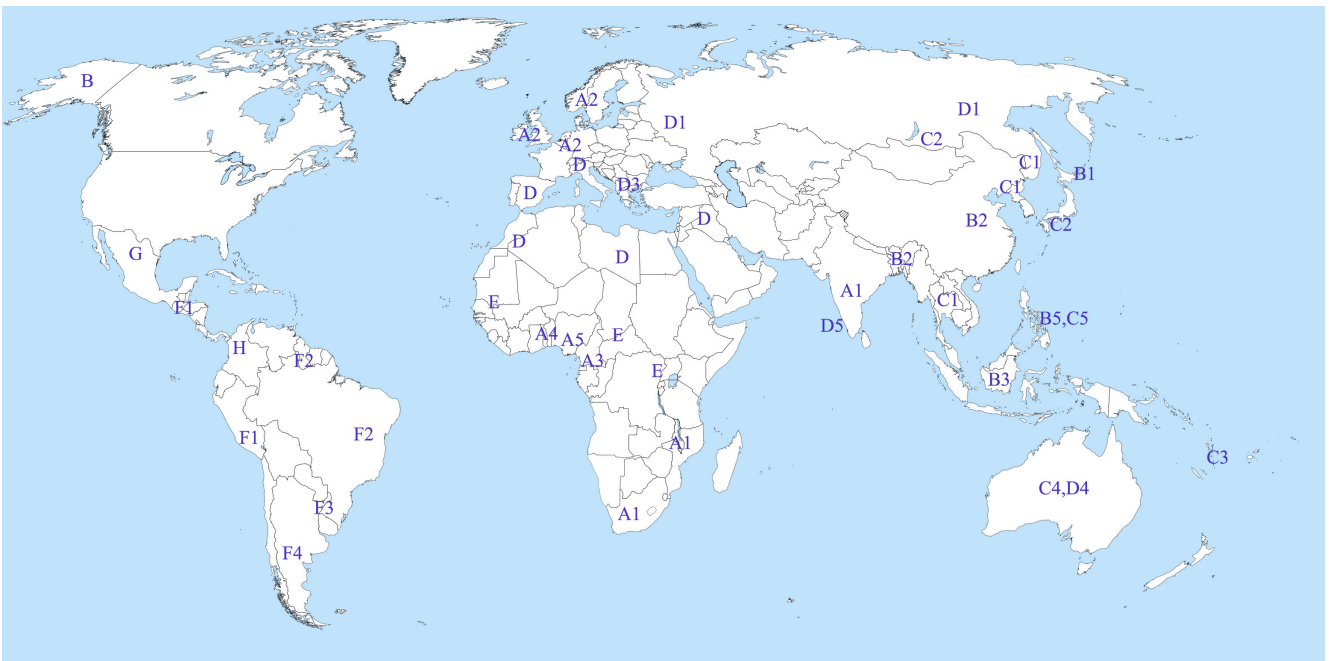


Figure 6. Répartition géographique des génotypes du VHB (Schaefer, 2007).

C. Les génotypes du VHB

Le VHB peut être classifié en 8 génotypes (A-H), différents de 8% au moins et identifiés grâce à l'analyse de la séquence des génomes complets, et en 24 sous-génotypes, différents de 4% au moins et identifiés par des analyses phylogénétiques [pour revue, consulter les références (Schaefer, 2005; Schaefer, 2007)]. Bien avant la classification en génotypes, très rapidement après la découverte du virus, différents sous types du virus ont été identifiés dans le sérum des patients, permettant le classement des virus en quatre sérotypes. Sur tous les virus, le déterminant antigénique *a* est présent au niveau de la boucle antigénique entre les acides aminés 124 et 147 de la petite protéine de surface (S). Quant à la différence entre les déterminants exclusifs *d/y* et *w/r*, elle résulte respectivement de la substitution d'une lysine (K) en une arginine (R) à la position 122 ou 160. Ainsi quatre sérotypes, *adr*, *adw*, *ayw* et *ayr*, toujours utilisés aujourd'hui, correspondent à la combinaison des différents déterminants antigéniques. La découverte de déterminants additionnels a permis l'identification de quatre sous types différents pour *ayw* (*ayw1*, *ayw2*, *ayw3* et *ayw4*) et de deux pour *adw* (*adw2* et *adw4*). La correspondance entre les génotypes et les sérotypes ainsi que leurs différences génomiques est indiquée dans le tableau 4.

GENOTYPES / SEROTYPES			
Génotype	Sérotipe prédominant	Différences dans les ORF	Longueur du génome (pb)
A	Adw2 (ayw1)	Insertion des acides aminés 153 et 154 dans l'antigène de capsid (HBc).	3221
B	Adw2 (ayw1)		3215
C	Adr et ayr		3215
D	Ayw1, 2 et 3	Délétion des acides aminés 1 à 11 du domaine Pre-S1.	3182
E	Ayw4 (adw 2)	Délétion de l'acide aminé 11 du domaine Pre-S1.	3212
F	Adw4		3215
G	Adw2	Insertion de 12 acides aminés dans l'antigène HBc. Délétion de l'acide aminé 11 du domaine Pre-S1.	3248
H	Adw4		3215

Tableau 4. Correspondances entre les génotypes et les sérotypes du VHB et présentation des différences génétiques principales entre les génotypes (Schaefer, 2005; Schaefer, 2007). Les sous-types entre parenthèses sont rarement observés dans le génotype correspondant (Kidd-Ljunggren et al, 2002). La taille de référence du génome du VHB est de 3215 nt.

Une des principales causes de l'infection par le virus de l'hépatite B avant la mise en place de la vaccination consistait en la contamination périnatale des nourrissons. Ceci a conduit à regrouper les différents génotypes dans diverses régions du monde (Fig. 6) bien que des migrations longues distances aient contribué à casser ce type de répartition géographique. Par exemple, dans un pays comme les Etats Unis, dont la population est issue du mélange de

différents groupes ethniques, les huit génotypes peuvent être retrouvés, alors qu'en Europe, uniquement deux génotypes majoritaires (A et D) sont présents.

La recombinaison entre différents génotypes suite à des infections multiples est fréquente. En moyenne, selon les études, on recenserait environ 12% de doubles infections et 0,9% de triples. Une double infection signifie qu'une personne a été contaminée par deux souches ou plus, soit simultanément par un porteur doublement infecté, soit par plusieurs porteurs. On parle de co-infection si toutes les souches de virus ont été acquises avant l'apparition d'une séroconversion et de super-infection / ré-infection lorsque le second virus est acquis après une séroconversion. Parfois, les doubles infections conduisent à l'apparition séquentielle de différentes souches virales suite à une réponse immunitaire spécifique ou à un effet variable des traitements contre les différents génotypes du virus. Par exemple, il a été décrit qu'un traitement à base d'interféron chez des patients majoritairement porteurs de virus de génotype A, pouvait provoquer un basculement vers le génotype D chez ces malades (Gerner et al, 1998; Hannoun et al, 2002). Si la co-infection peut conduire à un échange de matériel génétique direct entre plusieurs génotypes, le mécanisme de recombinaison est encore inconnu (Schaefer, 2007). Cependant, de nombreux génotypes hybrides ont été observés dans certaines régions du monde : A/C au Vietnam, C/D au Tibet, A/D en Afrique ou B/C en Asie. Des recherches supplémentaires sont donc nécessaires afin de déterminer si les échanges entre génotypes sont la conséquence d'une recombinaison génétique directe entre deux souches virales ou si elles sont la conséquence d'une adaptation rapide du VHB à un environnement génétique et immunologique particulier associé à certaines populations humaines (Schaefer, 2007). En effet, l'importante capacité de réplication du VHB qui permet la production de 3×10^{12} particules virales par jour (Nowak et al, 1996) et le nombre d'erreurs élevé engendré par la polymérase virale, conduisent à la production de génomes viraux dont chaque nucléotide est substitué chaque jour (Schaefer, 2007).

D'un point de vue clinique, il semblerait que la nature du génotype puisse influencer la sévérité de la maladie. Une étude ancienne sur des chimpanzés visant à étudier les différences entre les génotypes A, C et D, a en effet montré que des singes infectés par les génotypes A ou C développaient des hépatites aiguës dans 33% des cas alors que 87% d'entre eux en développaient lorsqu'ils étaient infectés par le génotype D (Tabor et al, 1983). Plus tard, il a été décrit par de nombreuses équipes que le génotype C provoquerait des dommages hépatiques plus sévères que le génotype B (Kao et al, 2000; Shiina et al, 1991a; Shiina et al, 1991b; Tsubota et al, 2001), bien qu'il semblerait qu'à long terme, le risque de développer ces pathologies soit similaire (Sumi et al, 2003; Yuen et al, 2003). En ce qui concerne les génotypes A et D, l'infection par le génotype D serait associée à des maladies plus sévères ainsi qu'au développement de CHC chez

de jeunes patients (Thakur et al, 2002). Globalement, puisque la majorité des études proviennent d'Asie du sud-est, les principales données concernent les génotypes B et C. Il existe peu d'informations sur les génotypes actifs en Europe, en Amérique ou en Afrique. Des études supplémentaires doivent donc être réalisées afin de caractériser les différences entre les huit génotypes (Schaefer, 2007). D'autre part, l'induction de la chronicité serait variable selon le génotype, le A induirait plus de chronicité que les génotypes B et C, alors que le génotype D serait associé à de nombreuses hépatites aiguës. Enfin, l'effet des différents génotypes sur l'efficacité de la vaccination et des traitements a été étudié. Si des expériences sur des singes vaccinés avec un génotype et infectés avec d'autres génotypes ont montré que ces derniers étaient protégés contre l'infection, il est recommandé de vacciner avec le génotype présent dans région géographique. En effet, les premiers cas d'échappement après la vaccination ont été décrits dans des régions vaccinées avec un génotype A alors que le génotype D était prédominant. Concernant une réponse génotype dépendante aux traitements, peu de données sont disponibles. Cependant, il a notamment été démontré que le génotype B répondait mieux aux interférons que le génotype C, et que sous lamivudine, le risque de développer des résistances à court terme était plus élevé avec le génotype A qu'avec le génotype D (Schaefer, 2007).

II. Virus satellite

Le virus de l'hépatite D (VHD) n'appartient pas à la famille des hepadnaviridae, mais est un virus satellite capable de se répliquer uniquement en présence du VHB auquel il emprunte les protéines d'enveloppe (Bonino et al, 1986; Bonino et al, 1984). Pour le moment, le VHD est le seul agent sous viral connu infectant le règne animal. Il a été classé dans un nouveau genre de virus, le genre delta virus. Plusieurs aspects l'apparentent aux viroïdes des plantes, dont le génome est un ARN monocaténaire circulaire qui se réplique en cercle roulant dans le noyau de la cellule infectée [pour revue, consulter les références (Poisson et al, 1995; Rizzetto, 2009)].

Etant donné que les enveloppes du VHD et du VHB sont constituées des mêmes composants, il est probable que ces deux virus partagent certains points communs lors des premières interactions avec la cellule cible. Par exemple, il a récemment été démontré que les 75 premiers acides aminés de la grande protéine de surface (L) étaient nécessaires à l'infection du VHD comme à celle du VHB (Blanchet & Sureau, 2007), tout comme le déterminant de l'infectivité présent dans la boucle antigénique des protéines d'enveloppe (Abou-Jaoude & Sureau, 2007; Jaoude & Sureau, 2005; Salisse & Sureau, 2009).

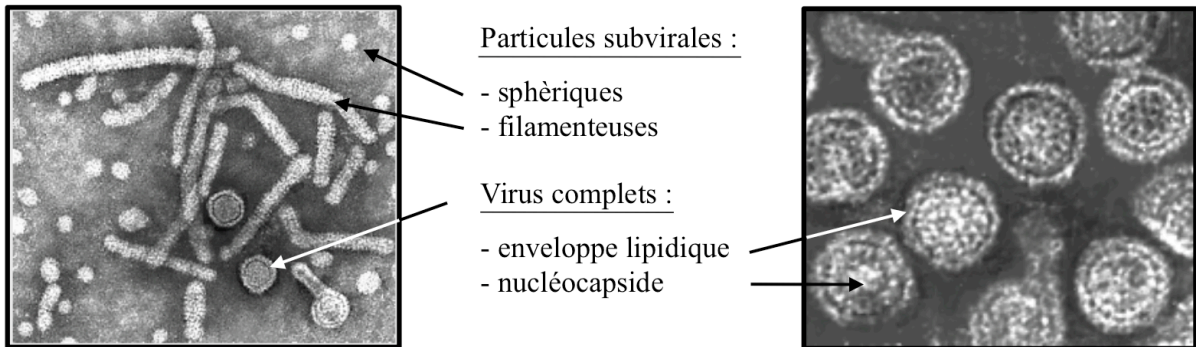


Figure 7. A : Photo de microscopie électronique montrant les différentes formes de particules virales retrouvées dans le sérum des patients infectés par le VHB. B : Photo de microscopie électronique montrant des particules virales complètes renfermant une nucléocapside. Source : Université de Cape Town, Afrique du Sud, <http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/hepb.html>.

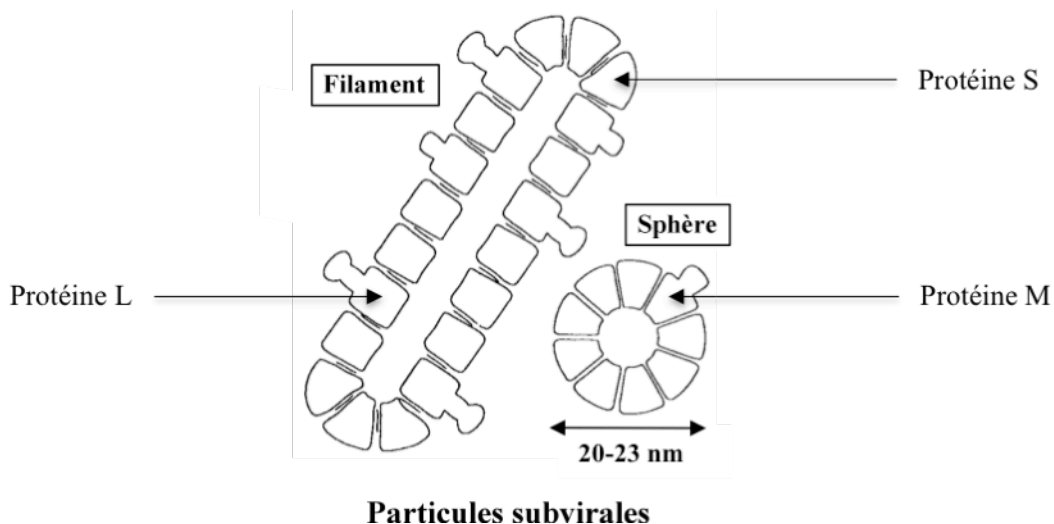


Figure 8. Schématisation des particules subvirales (Gerlich et al, 1993). Les trois protéines d'enveloppe sont représentées : S pour la petite protéine, M pour la protéine moyenne, et L pour la grande protéine. La taille des particules sphériques, selon une étude de cryo-microscopie électronique réalisée en 2005, est de 20-23 nm.

CARACTERISTIQUES STRUCTURALES

I. Structure des particules virales complètes et des particules subvirales

L'observation du sérum d'un malade atteint d'une hépatite virale B par microscopie électronique révèle la présence de 3 types de particules virales morphologiquement différentes (Fig. 7A). On distingue des particules virales complètes, d'un diamètre de 42 nanomètres (nm) (Fig. 7B) connues sous le nom de particules de Dane (Dane et al, 1970), et des particules dites subvirales, très excessivement représentées, de 20 nm de diamètre et de forme sphérique ou filamenteuse. Les formes allongées, moins représentées, peuvent atteindre une longueur de plusieurs centaines de nanomètres. Les formes sphériques, plus abondantes, peuvent atteindre le nombre de 10^{13} copies/ml dans le sang d'un malade, alors que les virus complets n'y sont présents qu'au nombre de 10^4 à 10^9 copies/ml.

A. *Particules subvirales*

Les particules subvirales dont le titre dans le sérum des patients peut atteindre un niveau 10 000 fois supérieur à celui des virus complets (Bruss, 2007) sont des enveloppes lipoprotéiques vides constituées de lipides d'origine cellulaire et d'antigènes viraux de surface (AgHBs) (Fig. 8) (Gerlich et al, 1993). Ces derniers correspondent à trois glycoprotéines présentes à la surface des particules virales. On distingue la petite protéine (S pour Small, aussi appelée protéine majeure), la protéine moyenne (M pour Medium) et enfin la grande protéine (L pour Large) (Heermann et al, 1984; Stibbe & Gerlich, 1983). Elles partagent toutes les trois, du côté C-terminal, une séquence commune en acides aminés (AA) correspondant à la petite protéine.

Les particules sphériques sont principalement composées de protéines S avec quelques protéines M. La protéine L n'est présente que dans les virions et les particules subvirales filamenteuses (Heermann et al, 1984).

L'analyse de la composition biochimique des particules subvirales a démontré qu'elles étaient composées principalement de protéines puisque les lipides ne constituent que 25% de leur masse (Gavilanes et al, 1982). Ainsi le ratio lipides/protéines de l'enveloppe des particules est très faible (0,3 environ) comparé à celui d'une membrane cellulaire classique qui est en moyenne de 1. La nature des lipides qui composent l'enveloppe virale est la suivante (Gavilanes et al, 1982):

≈ 67% de phospholipides,

≈ 15% de cholestérol,

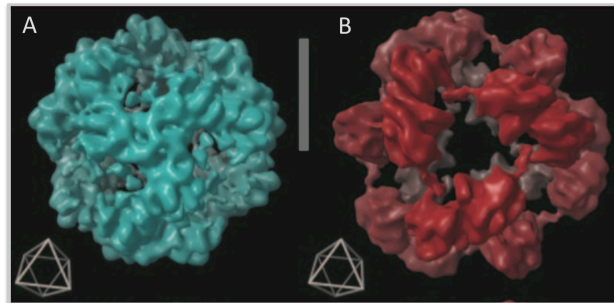


Figure 9 : Reconstruction 3D de particules subvirales issues de sérum de souris transgéniques exprimant la protéine S. La résolution est de 12 Å. La barre d'échelle correspond à 100 Å. La figure en bas à gauche de chaque structure représente la symétrie octaédrique des particules et montre leur orientation. (A) : Petite particule (20 nm). (B) : Grande particule (23 nm). Source : (Gilbert et al, 2005).

≈ 14% d'esters de cholestérol,

≈ 3% de triglycérides.

En 2005, la structure tridimensionnelle de particules subvirales issues de sérum de souris transgéniques exprimant la protéine S du VHB a été déterminée par cryo-microscopie électronique (Gilbert et al, 2005). Cette étude a mis en évidence deux tailles de particules subvirales différentes (Fig. 9) en accord avec une étude antérieure (Yamaguchi et al, 1998) qui avait démontré que selon la source (levure ou sérum de patients) et la préparation des échantillons, deux tailles de particules pouvaient être retrouvées, que leur forme était ovoïde, qu'elles étaient vides et que leur surface était interrompue par des pores.

Compte tenu de la similarité de structure entre les particules de taille différente, de leur symétrie octaédrique commune, de leur masse identique, et de la position de leurs axes ou centres de symétrie, les auteurs ont formulé une hypothèse selon laquelle les deux types de particules seraient formés à partir d'un nombre identique de sous-unités protéiques organisées de façon différente. Ces sous-unités correspondent à des dimères d'antigène HBs capables de s'auto assembler en interagissant les uns avec les autres. Le nombre total de protéines S par particule est estimée à 48. Selon le type d'interaction entre les dimères, et donc selon la conformation des protéines S au moment de l'assemblage des particules, la structure finale obtenue serait différente, aboutissant à des particules plus ou moins grande (Gilbert et al, 2005).

L'analyse de la densité aux électrons des particules a montré qu'elles ne contenaient pas de région dont la densité était caractéristique d'une bicouche lipidique. Ces résultats sont en accord avec un modèle (Sato et al, 2000) selon lequel les lipides des particules subvirales ne seraient pas organisés en une bicouche lipidique classique, mais seraient figés de façon inhabituelle à la surface des particules par leur contact très étroit avec les protéines.

Contrairement aux virions, les particules subvirales sont dépourvues de nucléocapside et d'ADN viral, ce qui ne leur confère aucune capacité d'infection. Il a été suggéré que ces particules défectives pourraient permettre aux virus d'échapper au système immunitaire en saturant les anticorps neutralisants (Ganem, 1991; Seeger et al, 2007). Il a également été proposé que ces particules contribueraient à l'installation d'une tolérance immunitaire vis à vis du VHB et permettraient ainsi le développement d'une infection chronique (Gerlich & Kann, 2005). Même si ces hypothèses n'ont pas été vérifiées expérimentalement, elles restent plausibles, d'autant plus qu'aucun rôle n'a été attribué aux particules subvirales au cours du cycle viral (Chai et al, 2008). En effet, la production de ces particules incomplètes en une aussi grande quantité laissait suspecter un rôle au cours du cycle de multiplication du virus. Toutefois, seul un rôle au cours de l'étape d'infection du DHBV a été mis en évidence. En faible quantité, les particules subvirales du DHBV peuvent amplifier l'infection en favorisant la réplication virale et

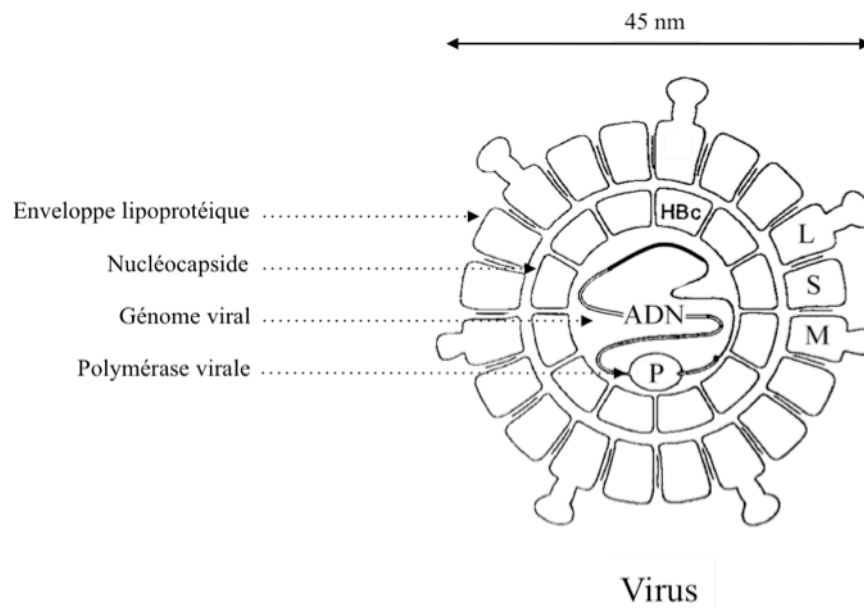


Figure 10. Schématisation d'une particule virale complète (Gerlich et al, 1993). Les trois protéines d'enveloppe sont représentées : S pour la petite protéine, M pour la protéine moyenne, et L pour la grande protéine. La taille des virions, selon une étude de cryo-microscopie électronique réalisée en 2007, est de 45 nm (Seitz et al, 2007).

l'expression de gènes viraux, alors qu'en quantité importante elles sont inhibitrices (Bruns et al, 1998). De plus, toujours pour le DHBV, il a été montré que seules des particules contenant la grande protéine pouvaient bloquer l'infection (Klingmuller & Schaller, 1993), ceci étant en accord avec le rôle majeur de cette protéine lors de l'infection (Glebe & Urban, 2007). Il est à noter que ces résultats sont en contradiction avec une étude récente montrant que les particules subvirales du VHB n'inhibent pas le processus d'infection (Chai et al, 2008).

B. Particules virales complètes

1. Structure générale

Les particules complètes infectieuses (Fig. 7B et 10), ou particules de Dane (Dane et al, 1970), possèdent une enveloppe lipoprotéique dont l'exacte composition en lipide est inconnue puisqu'elle n'a été estimée qu'à partir de celle des particules subvirales (Gavilanes et al, 1982). Cependant, une étude récente a démontré que la présence de cholestérol dans cette enveloppe était indispensable au processus d'infection, après l'étape d'absorption des virus à la surface des cellules (Bremer et al, 2009). Leur enveloppe est enrichie en protéines L comme celle des particules filamenteuses, en contraste avec la composition de l'enveloppe des particules subvirales sphériques essentiellement constituée de protéines S et de quelques protéines M (Heermann et al, 1984). Enfin, de la même façon que dans les particules subvirales, les protéines de l'enveloppe sont étroitement associées les unes avec les autres via la mise en place de ponts disulfures intra- et interchaînes (Mangold et al, 1995; Wounderlich & Bruss, 1996).

Au cœur de chaque virion, protégée par l'enveloppe virale, on retrouve une nucléocapside d'environ 30 nm de diamètre, composée d'AgHBc, qui adopte une symétrie icosaédrique (Crowther et al, 1994; Wingfield et al, 1995) (Fig. 10). Après un traitement des virus par un détergent non ionique, cette nucléocapside devient accessible aux anticorps anti-HBc bien qu'elle reste associée à l'enveloppe virale comme en témoigne son immunoprécipitation par des anticorps anti-HBs. Pour libérer complètement les nucléocapsides de leur enveloppe, l'utilisation additionnelle d'un agent réducteur est nécessaire (Bruss & Ganem, 1991b) probablement pour réduire les ponts disulfures reliant les protéines d'enveloppe entre elles. En effet, l'étude de la structure des virions par cryo-microscopie électronique n'ayant pas révélé de liaisons covalentes entre l'enveloppe virale et la nucléocapside (Dryden et al, 2006; Seitz et al, 2007), il est probable que les ponts disulfures entre les protéines S, M et L permettent l'élaboration d'un réseau protéique emprisonnant la capsidie et dont la réduction permettrait sa libération.

Enfin, à l'intérieur de la nucléocapside, on retrouve non seulement le génome viral associé à la polymérase virale (Bartenschlager & Schaller, 1992; Hirsch et al, 1990; Lott et al,

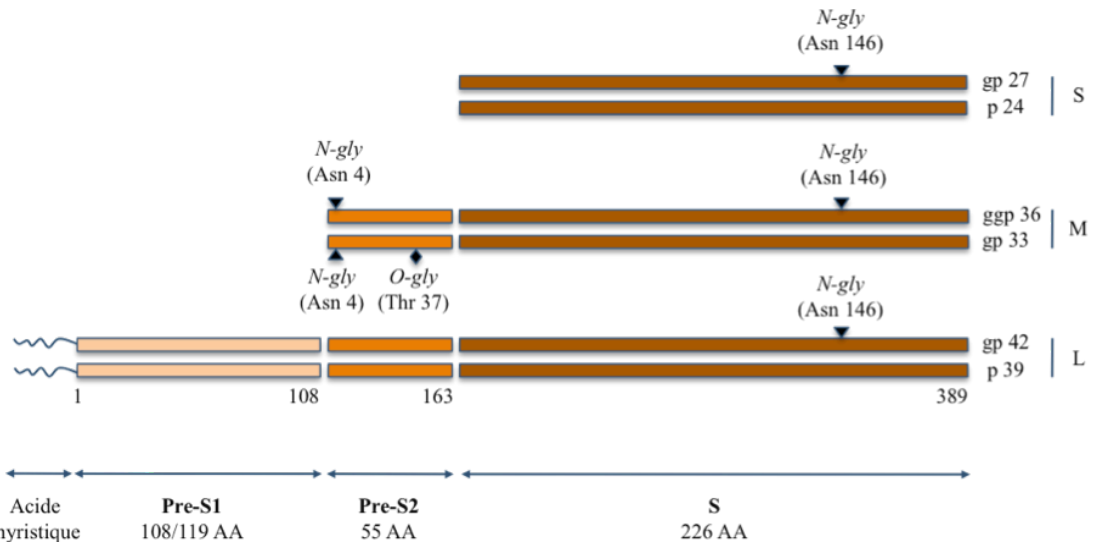


Figure 11. Représentation schématique de la structure et des modifications post-traductionnelles des protéines de surface du VHB. Les différentes formes non glycosylées (p), monoglycosylées (gp), ou diglycosylées (ggp) des protéines S, M et L sont indiquées à droite de la figure. Les sites de *N*- (*N*-gly) et *O*-glycosylations (*O*-gly), ainsi que leurs positions sur les acides aminés des domaines S et Pre-S2 sont indiqués. AA: acide aminé.

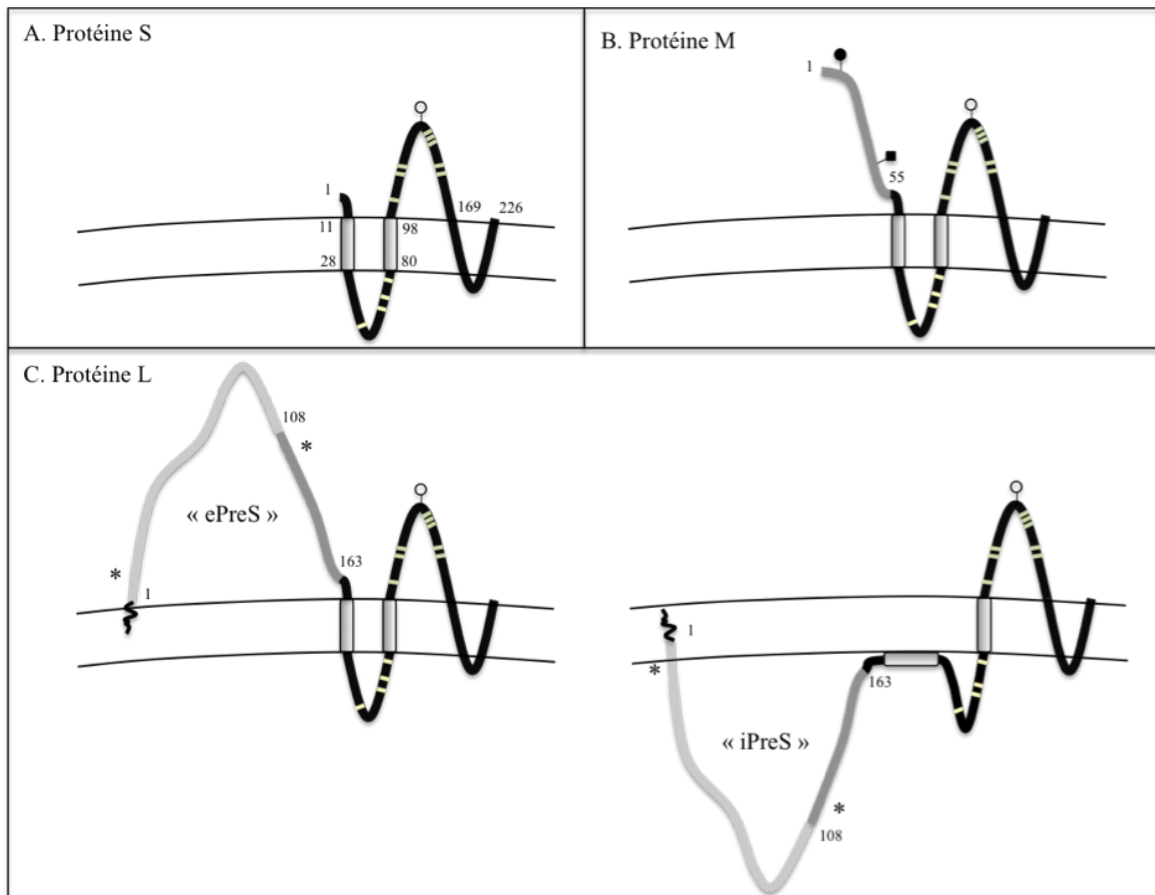


Figure 12. Topologie prédite des protéines d'enveloppe du VHB. Topologie des protéines S (A), M (B) et L (C). Les cercles vides correspondent au site de *N*-glycosylation sur l'asparagine 146 utilisé dans 50% des protéines. Le cercle plein représente la *N*-glycosylation sur l'asparagine 4 du domaine pre-S2 et le carré plein la *O*-glycosylation sur sa thréonine 37. Les petits traits correspondent aux cystéines de la boucle antigénique engagées dans des ponts disulfures (verts) et de la boucle cytoplasmique I libres (jaunes). Les astérisques indiquent la position des sites potentiels de glycosylation du domaine Pre-S de la protéine L. Les chiffres indiquent la position des domaines Pre-S dans les protéines L et M, et la position des domaines transmembranaires dans la protéine S, sachant que seule la position du domaine TM2 est clairement définie. Les deux cylindres gris représentent les signaux topogéniques I et II, correspondant globalement aux domaines TM1 et TM2.

2000; Lott et al, 2003) mais aussi des protéines d'origine cellulaire telles que des protéines chaperon (Beck & Nassal, 2003; Hu et al, 2004; Hu & Seeger, 1996; Hu et al, 1997; Wang et al, 2002) et une sérine/thréonine kinase phosphorylant la protéine HBc (Albin & Robinson, 1980; Daub et al, 2002; Enomoto et al, 2006; Kann & Gerlich, 1994; Kau & Ting, 1998).

2. L'enveloppe virale

a. Caractéristiques générales des protéines S, M et L

L'enveloppe lipoprotéique du virus de l'hépatite B contient trois protéines issues de la traduction d'un seul cadre de lecture possédant trois codons d'initiation différents et un seul codon stop. Ainsi, les séquences peptidiques de la petite protéine d'enveloppe (S, 226 acides aminés et 24 kDa), de la protéine moyenne (M, 281 acides aminés et 30kDa) et de la grande protéine (L, 389 acides aminés et 39 kDa pour le sous-type ayw) sont identiques dans leur portion C-terminale (Fig. 11) (Heermann et al, 1984). La région C-terminale commune aux trois protéines de l'enveloppe est appelée domaine S, celle commune aux protéines M et L correspond au domaine Pre-S2 et celle spécifique à la grande protéine est la région Pre-S1. Dans le cas du DHBV, seules deux protéines majeures, S et L, sont détectées. Elles possèdent, comme pour le VHB, une extrémité C-terminale commune (domaine S), alors que la protéine L est prolongée par la région Pre-S à son extrémité N-terminale.

Lors de leur traduction, les protéines de surface sont insérées dans la membrane du réticulum endoplasmique rugueux (RE) grâce à deux signaux topogéniques (I et II), présents dans leur domaine S, qui déterminent l'orientation des protéines dans la membrane (Fig. 12) (Bruss & Ganem, 1991a; Eble et al, 1986; Eble et al, 1987; Simon et al, 1988). Le modèle actuel concernant la topologie transmembranaire de la protéine S consiste en l'exposition lumineuse de ses extrémités N- et C-terminales (*ie.* à l'extérieur des virions) (Bruss, 2007; Eble et al, 1986; Eble et al, 1987; Stirk et al, 1992) (Fig. 12). La protéine doit donc traverser au moins deux fois la bicouche lipidique. Les logiciels de prédiction de structure secondaire prédisent l'existence de quatre hélices transmembranaires dans le domaine S (Berting et al, 1995; Stirk et al, 1992), les signaux I et II correspondant aux deux premiers domaines, appelés TM1 et TM2, et la région C-terminale (AA169-AA226 de la protéine S) abritant les deux autres domaines, TM3 et TM4, dont la fonction d'ancrage n'a pas été démontrée expérimentalement. Ces quatre domaines transmembranaires délimitent deux boucles cytoplasmiques (CYL-I et II) et une boucle antigénique (AGL) dont les positions respectives sont indiquées dans la figure 12.

b. Position et caractéristiques du premier domaine transmembranaire (TM1)

Si la position du second domaine transmembranaire est clairement définie entre les acides aminés 80 et 98 par les logiciels de prédiction de structure secondaire (Bruss, 2007), celle du

Profil d'hydrophobicité de la grande protéine d'enveloppe du VHB

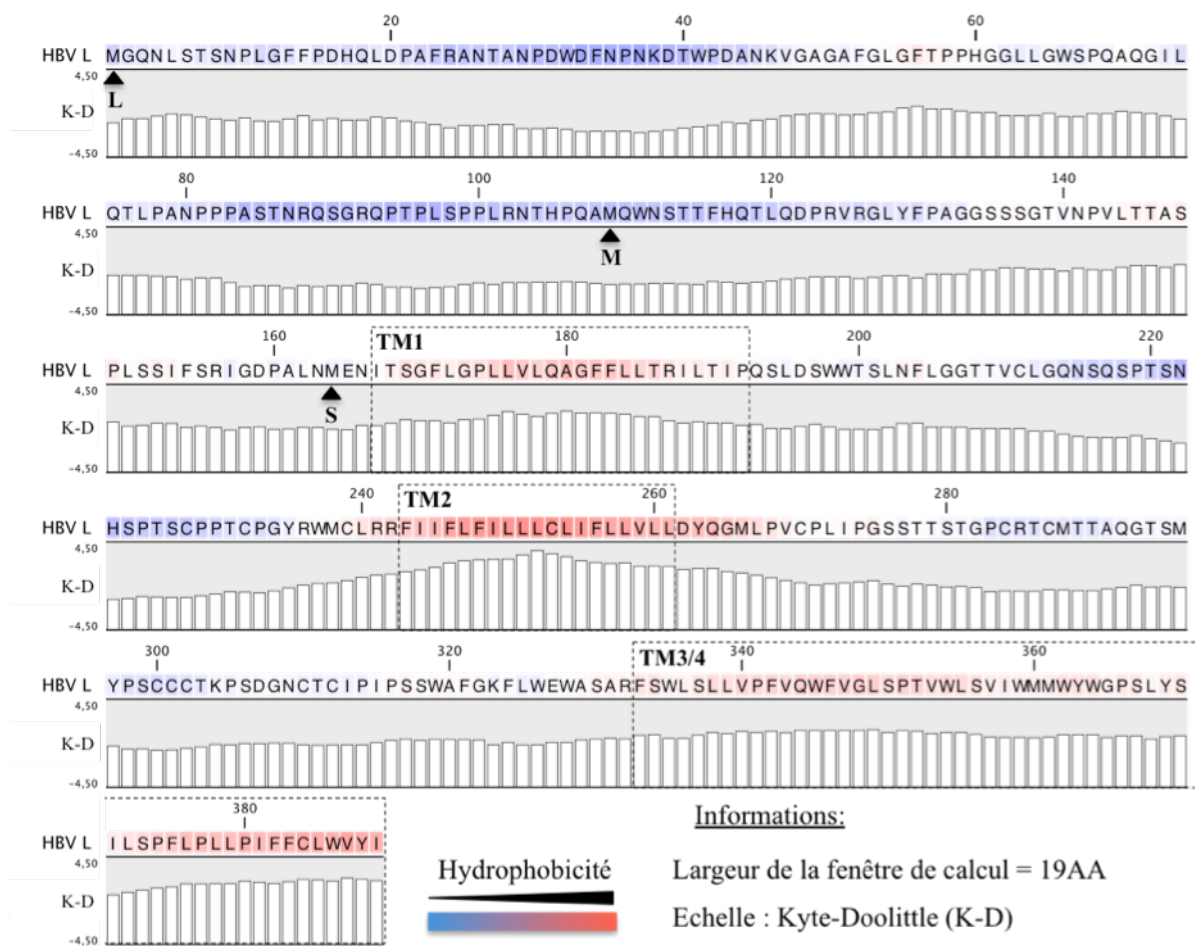


Figure 13. Profil d'hydrophobicité de la protéine L du VHB. L'échelle « Kyte-Doolittle » est beaucoup utilisée pour délimiter des régions hydrophobes au sein des protéines. Les régions dont le score est supérieur à 0 sont hydrophobes. La largeur de la fenêtre de calcul correspond au nombre d'acides aminés examinés à la fois pour déterminer le score d'un résidu. La taille de la fenêtre doit être adaptée à la taille de la région dont on veut mettre en évidence l'hydrophobicité. Classiquement, une fenêtre de 19-21 acides aminés permet de mettre en évidence clairement les domaines transmembranaires dont les résidus ont généralement un score supérieur à 1,6. La position des domaines transmembranaires est indiquée par les cadres en pointillés. Hormis la position du domaine TM2 très hydrophobe, la position des autres domaines transmembranaires est indicative et n'est pas clairement définie. Les triangles noirs indiquent la position des codons d'initiations de la traduction des protéines L, M et S, respectivement. La signification du code de couleur est indiquée sur la figure. Logiciel : « CLC Main Workbench », version 5.1, Mac OS X.

domaine TM1 est variable selon la méthode de prédiction utilisée et plusieurs positions sont donc retrouvées dans la littérature. Par exemple, en ne citant que quelques équipes travaillant sur les protéines d'enveloppe, on retrouve les positions suivantes :

- (i) 11-28 (Prange et al, 1992; Prange & Streeck, 1995);
- (ii) 8-28 (Berting et al, 2000; Chojnacki et al, 2005),
- (iii) 7-28 (van Hemert et al, 2008),
- (iv) 8-22 (Bruss, 2007),
- (v) 4-24 (Blanchet & Sureau, 2006),
- (vi) 7-22 (Eble et al, 1987), etc.

Cette variabilité peut probablement être attribuée à plusieurs caractéristiques du domaine TM1, telles que son hydrophobicité globale relativement faible comparée à celle du domaine TM2 (Fig. 13), la présence d'acides aminés polaires (Gln 16 et Arg 24) dans sa séquence et la présence de deux prolines aux positions 11 et 28. Selon les auteurs et selon les logiciels de prédiction, la séquence hydrophobe GFLG marque le début du domaine TM1, l'arginine délimite sa fin, ou bien les deux prolines délimitent son début et sa fin. Au cours de ma thèse, la position arbitraire de référence que j'ai utilisée correspond à celle déterminée par la position des deux prolines (AA 11 à 28) également utilisée par Reinhild Prange et prédite notamment par les logiciels « PHDrhtm » (Rost et al, 1996) et « NORSp » (Liu & Rost, 2003). De façon surprenante, il a été rapporté que ce domaine transmembranaire pouvait être clivé à pH physiologique, au sein des particules virales, par la chymotrypsine (site de coupure : Gln16) (Lu et al, 1996), ainsi sa position dans l'enveloppe virale reste discutable.

c. Topologie des boucles hydrophiles du domaine S

La première boucle cytoplasmique (AA 29-79) sépare les signaux topogéniques I et II. Cette boucle contient quatre résidus cystéines. Une analyse mutationnelle a démontré que la mutation de une à trois des quatre cystéines par une sérine bloquait le mécanisme d'assemblage des particules subvirales (Mangold & Streeck, 1993), alors que ces cystéines ne sont pas impliquées dans la formation de ponts disulfures (Wounderlich & Bruss, 1996). Le rôle de cette région dans l'étape d'assemblage viral sera détaillé dans le chapitre « Assemblage et sécrétion des particules virales », page 89.

La seconde boucle hydrophile (AA 99 à 169 environ) est située dans la lumière du RE entre les domaines TM2 et TM3. Elle porte le principal déterminant antigénique (*a*) des antigènes de surface qui se retrouve à la surface des virions après le bourgeonnement des particules virales au niveau de la membrane du RE. Elle est N-glycosylée *in vivo* sur l'asparagine 146 dans environ 50% des protéines d'enveloppe (Peterson et al, 1982) (Fig. 11 et 12). Selon un travail réalisé par Prange et Streeck en 1995, la glycosylation partielle des protéines S, M et L sur

cette asparagine pourrait être expliquée par l'orientation non uniforme des protéines dans la membrane du RE (Prange & Streeck, 1995). D'une part, l'association *in vitro* des protéines glycosylées et non glycosylées à des microsomes exclut l'hypothèse précédemment formulée selon laquelle l'absence de glycosylation proviendrait d'un défaut d'insertion des protéines dans la membrane du RE (Eble et al, 1986; Eble et al, 1990; Eble et al, 1987; Ostapchuk et al, 1994). D'autre part, dans un modèle basé sur l'utilisation de microsomes, la boucle antigénique des protéines glycosylées est protégée contre un clivage par la trypsine sur l'arginine 122 alors que celle des protéines non glycosylées est seulement partiellement protégée suggérant une différence de topologie entre les deux formes. De manière surprenante, l'ajout de détergent solubilisant la membrane des microsomes, ne permet pas le clivage total des protéines qu'elles soient glycosylées ou non, suggérant que la susceptibilité variable des formes non glycosylées au clivage ne dépende pas de leur orientation dans la membrane des microsomes mais plutôt d'un encombrement stérique. Après avoir validé ces résultats en utilisant une protéine S modifiée pour laquelle la corrélation entre le clivage par la trypsine et l'absence de glycosylation est parfaite, Prange et Streeck ont proposé un modèle selon lequel la deuxième boucle hydrophile du domaine S, située entre les domaines TM2 et TM3, serait soit exposée dans la lumière du RE pour les formes glycosylées, soit présente du côté cytoplasmique pour les formes non glycosylées. Le maintien de cette double topologie lors des étapes d'assemblage et de sécrétion des particules n'a pas été démontré (Prange & Streeck, 1995). Toutefois, cette hétérogénéité de structure expliquerait parfaitement la glycosylation partielle des protéines d'enveloppe observée *in vitro* et *in vivo*, contrairement aux modèles précédents représentant la boucle antigénique uniquement du côté luminal (Eble et al, 1986; Eble et al, 1987; Ostapchuk et al, 1994). Ce modèle est en accord avec l'hypothèse de Tiollais et Wain-Hobson formulée en 1984 selon laquelle la glycosylation partielle des protéines S pourrait être expliquée par l'existence d'un hétérodimère composé de deux molécules orientées de façon opposées (Tiollais & Wain-Hobson, 1984). Pour que la boucle antigénique soit exposée du côté cytoplasmique de la membrane du RE, cela implique soit que toute la structure soit inversée et donc que contrairement aux données expérimentales actuelles (Eble et al, 1986; Eble et al, 1990; Simon et al, 1988), la boucle cytoplasmique I (AA 29-79) soit transloquée dans la lumière du réticulum (ce qui est possible pour le DHBV); soit que les domaines TM2 et TM3 ne traversent pas la membrane mais restent accolés au niveau de la bicouche lipidique (Prange & Streeck, 1995). Il faut noter que *in vivo*, la topologie non uniforme du domaine S mise en évidence par sa susceptibilité variable au clivage par la trypsine est moins évidente, probablement du fait des nombreux ponts disulfures dans la boucle antigénique qui la rendent résistante aux coupures protéolytiques (Huovila et al, 1992). En effet, le domaine S des protéines d'enveloppe contient de nombreux résidus cystéine contrairement au

domaine Pre-S. Les huit cystéines de la boucle antigénique permettent de relier les protéines d'enveloppe entre elles grâce à de nombreux ponts disulfures intra et interchaînes (Mangold et al, 1995; Wounderlich & Bruss, 1996) et sont également impliquées dans la formation et le maintien de la structure du déterminant antigénique (*a*) (Mangold & Streeck, 1993; Mangold et al, 1995).

d. Topologie de la protéine M

La protéine M possède une topologie transmembranaire comparable à celle de la protéine S (Fig. 12B). Le domaine Pre-S2 est transloqué dans la lumière du RE probablement grâce à l'action du signal I présent dans son domaine S (Eble et al, 1990). Il est N-glycosylé sur l'asparagine 4 (Heermann et al, 1984; Stibbe & Gerlich, 1983) et O-glycosylé sur la thréonine 37 dans la majorité des génotypes (B-H) (Schmitt et al, 2004) (Fig. 11).

e. Topologie de la protéine L

Jusqu'en 1994, il a été admis que l'extrémité N-terminale de la protéine L, comme celle des protéines S et M, était transloquée cotraductionnellement dans la lumière du RE grâce au signal I du domaine S. Les domaines Pre-S1 et Pre-S2 étant accessibles aux anticorps monoclonaux et aux digestions enzymatiques (Heermann et al, 1984), il semblait logique que ces régions soient exposées à l'extérieur des particules virales et donc introduites dans la lumière du RE pendant leur synthèse. L'étude réalisée par Ostapchuk *et al* en 1994 a démontré que pendant la synthèse protéique, la localisation du domaine Pre-S et du signal I de la protéine L était cytosolique (Ostapchuk et al, 1994) (Fig. 12C). Cette observation a permis d'expliquer pourquoi la protéine L n'était pas glycosylée dans sa région Pre-S (Heermann et al, 1984), mais était myristoylée à son extrémité N-terminale, les enzymes catalysant ces réactions étant lumineuses et cytosoliques, respectivement. Toutefois quelques protéines L sont O-glycosylées sur la thréonine 37 du domaine Pre-S2 (Schmitt et al, 2004). La localisation cytosolique du domaine Pre-S a ensuite été attribuée à un signal d'inhibition de la translocation, localisé entre les acides aminés 70 et 94 du domaine Pre-S1 (sous-type ayw) (Bruss & Thomssen, 1994; Prange & Streeck, 1995), qui interagit avec une protéine cytosolique, Hsc70, de la famille des protéines chaperon (Lambert & Prange, 2003; Loffler-Mary et al, 1997; Prange et al, 1999; Swameye & Schaller, 1997). A la vue de ces données, il est clairement établi à ce jour qu'environ 50% des protéines L changent de conformation, après leur traduction, en transloquant leur domaine Pre-S du cytoplasme vers la lumière du RE (Bruss et al, 1994; Guo & Pugh, 1997; Ostapchuk et al, 1994; Prange & Streeck, 1995; Swameye & Schaller, 1997). Même si le mécanisme de translocation n'est pas encore bien compris, on sait qu'il est indépendant des protéines S et M et que la seule région transmembranaire de la protéine L nécessaire à ce processus correspond au domaine TM2

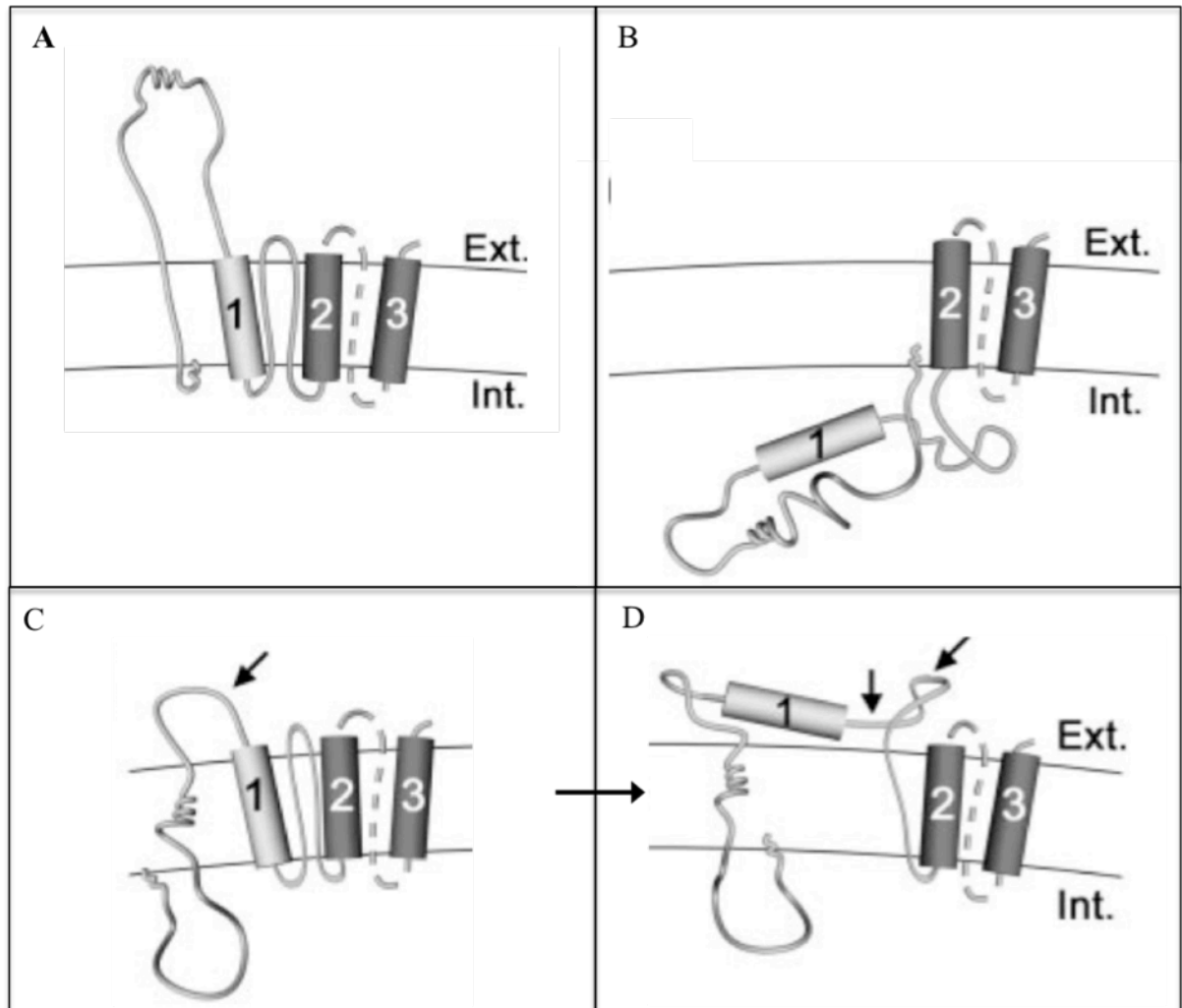


Figure 14. Topologie prédite de la grande protéine d'enveloppe du DHBV. Les domaines transmembranaires TM1, TM2 et TM3 sont indiqués par des cylindres numérotés 1, 2 et 3 respectivement. La région C-terminale des protéines d'enveloppe du DHBV, indiquée par des pointillés, reste non caractérisée et pourrait traverser la membrane plusieurs fois. (A) Topologie externe de la protéine L avec un domaine Pre-S transloqué et exposé à la surface des virions. (B) Topologie interne de la protéine L, avec les domaines Pre-S et TM1 disposés du côté cytoplasmique de la membrane du RE juste après la synthèse protéique. (C) Topologie intermédiaire de la protéine L dont le domaine Pre-S est partiellement transloqué. Cette topologie serait présente sur les virions (Guo & Pugh, 1997). (D) Conformation métastable de la protéine L dont les domaines Pre-S et TM1 sont transloqués. La région N-terminale du domaine Pre-S est représentée interne car elle est résistante aux coupures protéolytiques, cependant elle pourrait être à l'extérieur des virions dans une conformation résistante aux protéases (Grgacic & Schaller, 2000). Les flèches représentent les sites de digestion à la trypsine accessibles. Ext : Extérieur, Int : Intérieur. Source : (Chojnacki et al, 2005).

(Lambert & Prange, 2001). Ces observations sont en contradiction avec l'hypothèse initiale selon laquelle des oligomères de protéines S formeraient des pores dans les membranes permettant au domaine Pre-S1 de transloquer dans la lumière du RE (Berting et al, 1995; Bruss et al, 1994). De plus, plusieurs études récentes suggèrent que la translocation s'effectue au niveau du RE grâce à des protéines chaperon telles que Hsc70, Hsp40 et BiP, la dernière interagissant avec la forme transloquée du domaine Pre-S (Awe et al, 2008; Cho et al, 2003; Lambert & Prange, 2001; Lambert & Prange, 2003). La topologie double du domaine Pre-S1, à l'extérieur des virions (ePre-S), ou à l'intérieur des particules (iPre-S) réconcilie les deux fonctions de ce domaine qui est impliqué dans les étapes d'assemblage (Bruss, 2007) et d'infection du cycle viral (Glebe & Urban, 2007).

f. Données de topologie obtenues avec le modèle du DHBV

Des études complémentaires sur la topologie des protéines d'enveloppe ont été réalisées avec le modèle du DHBV. Bien que les résultats issus de ces études ne puissent pas être directement appliqués aux protéines de surface du VHB, ils suggèrent une flexibilité importante de la structure de la protéine L. En effet, elle n'adopterait pas seulement deux topologies, avec le domaine Pre-S à l'intérieur ou à l'extérieur des virions, mais elle existerait dans au moins quatre conformations caractérisées par :

- (i) un domaine Pre-S entièrement cytoplasmique. Cette forme est présente juste après la synthèse protéique (Grgacic et al, 2000; Grgacic & Schaller, 2000; Guo & Pugh, 1997) (Fig. 14B);
- (ii) un domaine Pre-S principalement à l'intérieur des virions, dont une petite partie en position C-terminale serait exposée à la surface des particules et accessible aux protéases (Grgacic & Schaller, 2000; Guo & Pugh, 1997) (Fig. 14C). Cette forme correspondrait à un intermédiaire, présent à la surface des particules, entre les formes dont le domaine Pre-S est complètement cytoplasmique et celle où le domaine est transloqué à l'extérieur des virions (Guo & Pugh, 1997) ;
- (iii) un domaine Pre-S dont la région C-terminale est inaccessible aux protéases du fait de son insertion dans la membrane ou d'un encombrement stérique (Grgacic & Schaller, 2000). Cette forme est associée à la translocation, à l'extérieur des particules virales, du domaine TM1 et de la partie N-terminale de la boucle cytoplasmique adjacente (Fig. 14D). Elle apparaît après le traitement des particules virales par un pH acide ou par un agent réducteur. Il faut noter que le traitement réducteur provoque la formation de particules, non hydrophobes, restant infectieuses alors que le traitement à pH acide, aboutit à la formation de particules hydrophobes et non infectieuses, probablement du fait de leur agrégation. Cette conformation de la protéine L pourrait correspondre à un intermédiaire non stable impliqué dans le processus de fusion (Grgacic & Schaller, 2000);

(iv) un domaine Pre-S presque totalement à l'extérieur des virions sensible aux digestions protéolytiques (Fig. 14A). Seule l'extrémité N-terminale du domaine Pre-S associée à l'acide myristique resterait insérée dans l'enveloppe virale (Guo & Pugh, 1997). Cette hypothèse est supportée par le fait que des anticorps reconnaissant les 20 premiers acides aminés du domaine Pre-S ne reconnaissent pas la protéine L à la surface des virions (Neurath et al, 1986b; Persing et al, 1987). Cependant, ce modèle est en contradiction avec des données démontrant que des anticorps ayant pour cible les acides aminés 12 à 23 du domaine Pre-S de la protéine L du DHBV sont capables d'immunoprécipiter des particules virales (Schmut, 2006).

Une autre particularité concernant la topologie de la protéine L a été mise en évidence par Grgacic *et al* en 2000 : la boucle cytoplasmique située immédiatement après le domaine TM1 serait capable de traverser deux fois l'enveloppe virale pour présenter un épitope à la surface des particules virales (Fig. 14A et C). En effet, il est possible d'immunoprécipiter des virions avec un anticorps reconnaissant la boucle cytoplasmique (Grgacic et al, 2000).

La translocation du domaine Pre-S de la protéine L du DHBV est dépendante de la protéine S (Grgacic, 2002; Grgacic et al, 2000) et d'une petite protéine S tronquée (St) (Grgacic & Anderson, 2005) contrairement à ce qui a pu être montré pour le VHB. L'oligomérisation des protéines S via notamment leur domaine TM1 amphipatique pourrait permettre la formation de pores dans l'enveloppe virale participant à la translocation de la région Pre-S (Grgacic, 2002; Guo & Pugh, 1997). Ainsi, si les protéines L des deux virus partagent certaines conformations communes, le mécanisme qui permet leur translocation ne semble pas conservé. Il impliquerait des protéines cellulaires pour le VHB et des protéines virales (S et St) et cellulaires pour le DHBV.

En conclusion, ces études démontrent une topologie dynamique des protéines d'enveloppe qui ne correspond probablement pas à un seul modèle. En effet, il apparaît clairement au cours du temps qu'il n'y aurait pas que le domaine Pre-S dont la topologie serait variable : (i) la première boucle cytoplasmique de la protéine L du DHBV traverserait l'enveloppe virale et se retrouverait à l'extérieur des virions ; (ii) le domaine TM1 de la protéine L du DHBV pourrait être transloqué à l'extérieur des virions ; (iii) le domaine TM1 de la protéine L du VHB, accessible à un clivage par la chymotrypsine, serait également accessible à la surface des virus ; (iv) la boucle antigénique non glycosylée des protéines S, M et L du VHB serait exposée à l'intérieur des particules virales alors que la forme glycosylée serait exposée à l'extérieur ; la position des domaines TM3 et TM4 est encore indéfinie.

3. Structure tridimensionnelle

Deux études récentes de cryo-microscopie électronique réalisées en 2006 (Dryden et al, 2006) et 2007 (Seitz et al, 2007) ont permis d'observer l'enveloppe virale avec une résolution de

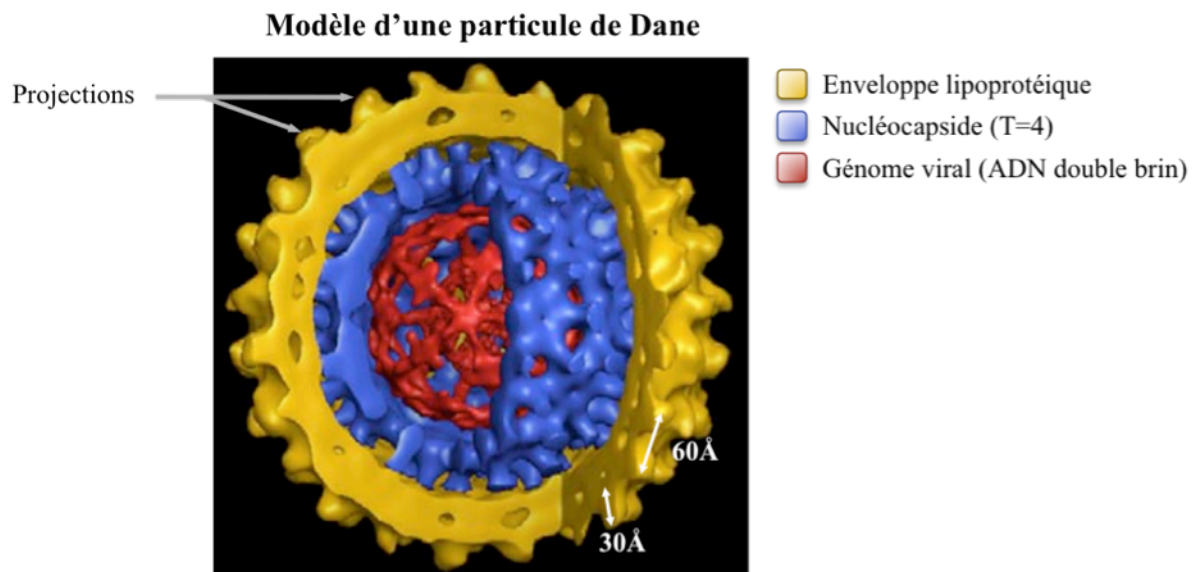


Figure 15. Modèle 3D d'une particule virale complète. Le modèle est établi à partir de la reconstruction tridimensionnelle par cryo-microscopie électronique de l'enveloppe virale (jaune) d'une part ; et d'une nucléocapside (T=4) (bleu), au sein d'un virion, contenant une molécule d'ADN viral double brin (rouge) d'autre part. A la surface de l'enveloppe lipoprotéique, on retrouve des projections de 30 Å de hauteur espacées de 60 Å qui correspondent vraisemblablement aux domaines Pre-S de la protéine L et Pre-S2 glycosylé de la protéine M. La capside arbore une symétrie icosaédrique tout comme le génome viral sous forme de cage dodécaédrique. Source : (Dryden et al, 2006).

28 et 22 Å respectivement. L'étude de Dryden *et al* a permis de mettre en évidence deux types de virions, de taille différente, dans le sérum des patients selon la capsidie qu'ils contiennent (T=3 ou T=4, *cf.* chapitre « Nucléocapside », page 41). Les virions dits « T3 », de plus petite taille, représentent environ 10% des particules virales complètes. Aucune différence morphologique ou fonctionnelle n'a été mise en évidence entre les deux types de particules. La reconstruction tridimensionnelle des virions a permis d'identifier, à la surface de l'enveloppe virale, la présence de projections d'une hauteur de 30 Å environ et dont l'espacement est proche de 60 Å. Le volume de ces projections correspondrait à une région protéique de 14 KDa environ pouvant être attribuée aux domaines ePre-S des protéines L ou aux domaines Pre-S2 glycosylés des protéines M. On retrouve entre 160 et 200 projections à la surface de chaque particule, alors que le volume de l'enveloppe peut contenir entre 370 et 400 domaines S (Dryden et al, 2006). Si cette hypothèse est exacte, cela signifie que 40 à 54% des protéines de l'enveloppe des virions correspondent à des protéines L et M, la protéine S correspondant alors à 46-60 % des protéines. D'après leur analyse de structure et compte tenu de l'existence de trois protéines de surface différentes, Dryden et ses collaborateurs ont émis l'hypothèse selon laquelle l'organisation de l'enveloppe virale, à la différence de celle des nucléocapsides, ne suivrait pas une symétrie icosaédrique. Cependant, la résolution relativement faible de leur reconstruction ne permet pas d'exclure la possibilité selon laquelle les domaines S des protéines d'enveloppe arboreraient une organisation icosaédrique, comme cela a été démontré par Seitz *et al*, et que seuls les domaines extérieurs des protéines L et M (projections) auraient une position variable incompatible avec cette symétrie. Enfin, cette première étude n'a pas réussi à mettre en évidence d'interactions claires entre l'enveloppe virale et la nucléocapside, confortant ainsi l'hypothèse selon laquelle les deux types d'architectures n'adopteraient pas la même organisation. Un premier modèle représentant la structure tridimensionnelle des particules virales a été réalisé grâce à cette étude. Il regroupe les reconstructions de l'enveloppe, de la nucléocapside et du génome viral (Fig. 15).

En 2007, Seitz et ses collaborateurs ont identifié deux phénotypes de virions « T4 » morphologiquement différents (Seitz et al, 2007). Le premier phénotype est caractérisé par une frontière quasiment invisible entre l'enveloppe virale et la nucléocapside conduisant à des particules d'aspect compact. Le deuxième est caractérisé par un espace clairement démarqué, de faible densité aux électrons, entre l'enveloppe et la nucléocapside donnant des particules espacées (*gapped particles*). Ces deux types de particules sont retrouvés en quantité comparable dans le sérum des patients, sont indistinguables par leur taille et ne peuvent pas être séparés par leur densité. Un troisième type de virion, minoritaire, est constitué de particules chimériques présentant un mélange des deux phénotypes. La reconstruction 3D des particules compactes et espacées a démontré que malgré l'assemblage compact des protéines de surface, l'enveloppe

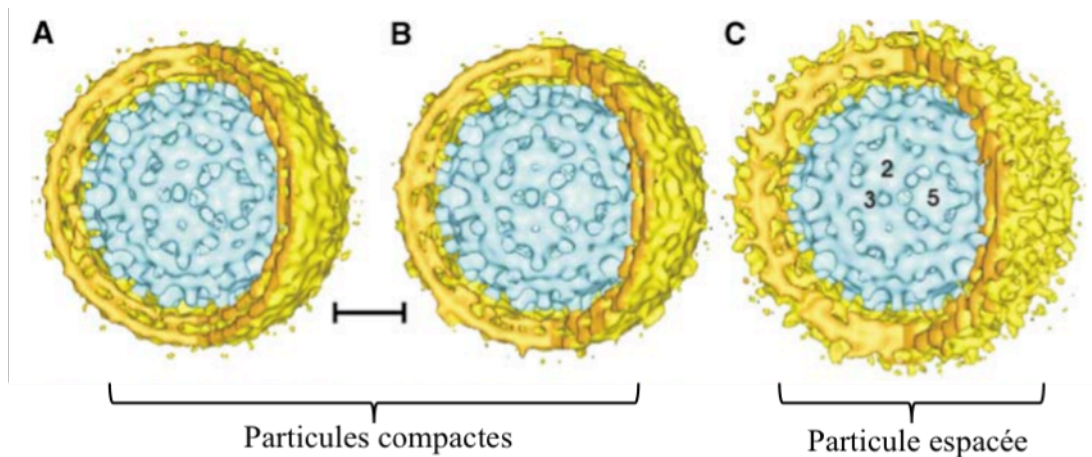


Figure 16. Représentation des particules compactes (A et B) et des particules espacées (C) à une résolution de 22 Å. La taille de la barre d'échelle est de 100 Å. Source : (Seitz et al, 2007).

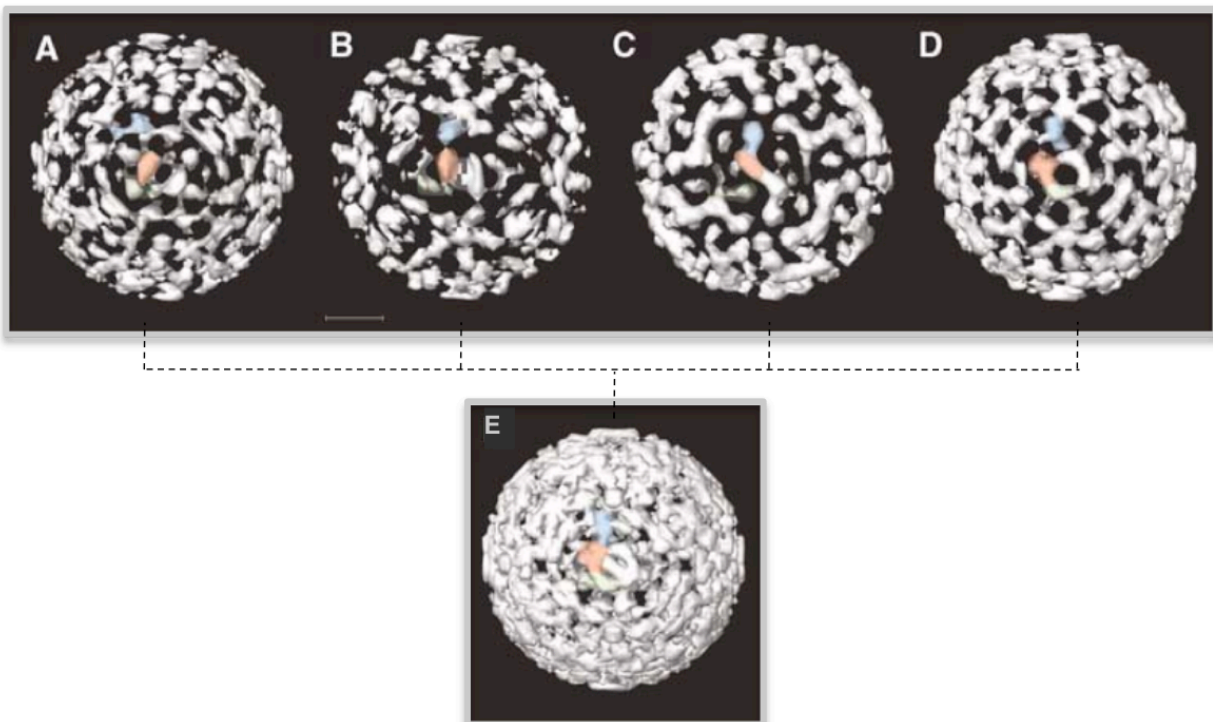


Figure 17. Organisation des antigènes de surface dans l'enveloppe virale. A-D : Chaque carte est réalisée grâce à l'analyse individuelle de 4 à 6 particules regroupées de par leurs caractéristiques structurales communes. Cette analyse repose sur la représentation des régions transmembranaires des protéines d'enveloppe de particules compactes. E : La superposition des cartes A, B, C et D ne permet pas d'observer la structure organisée de l'enveloppe virale, démontrant la nécessité d'analyser les particules virales individuellement. Source : (Seitz et al, 2007).

virale possédait le profil d'une bicouche lipidique classique, contrairement aux données obtenues avec les particules subvirales (Gilbert et al, 2005). Le tri des particules selon les deux phénotypes et selon l'orientation des excroissances visibles à la surface des nucléocapsides a permis de réaliser 3 cartes représentant la surface des particules virales (Fig. 16).

Les cartes A et B correspondent à des particules compactes et la carte C à une particule espacée dont la densité de l'enveloppe virale, espacée de la nucléocapside, est plus faible et donc moins ordonnée. Le contact entre l'enveloppe virale et la nucléocapside se fait grâce à l'interaction entre les excroissances formées par les dimères d'antigènes de capsid (HBc) et des protrusions qui émergent de la face interne de l'enveloppe. L'enveloppe des particules dont la structure correspond à celle de la carte A établit plus de contacts avec la nucléocapside que celle des virions répertoriés dans les cartes B et C (*cf.* chapitre « Nucléocapside », page 41). Ainsi, le nombre, la position et la taille des contacts entre l'enveloppe et la capsid, ainsi que la taille des protrusions émergeant de l'enveloppe varient entre les virions, suggérant une plasticité importante de la liaison entre l'enveloppe virale et la capsid. Cette hypothèse est cohérente avec l'existence de plusieurs régions de contact avec la capsid sur les antigènes de surface, au niveau du domaine Pre-S (Bruss, 1997; Poisson et al, 1997) et de la première boucle cytoplasmique du domaine S (Loffler-Mary et al, 2000; Poisson et al, 1997).

L'organisation précise des antigènes de surface dans l'enveloppe virale a pu être déterminée grâce à l'analyse individuelle de particules (Seitz et al, 2007). En effet, la stratégie consistant en l'analyse de plusieurs particules à la fois, sans classement préalable, afin de construire une structure moyenne n'est pas adaptée compte tenu de la plasticité de l'enveloppe qui provoque un bruit de fond important lorsque l'on analyse plusieurs entités à la fois (Fig. 17). Pour déterminer la position des protéines dans l'enveloppe, l'analyse a été concentrée sur l'observation des domaines transmembranaires denses aux électrons. Cette approche a permis d'identifier la sous-unité de base de l'enveloppe virale. Elle correspond à un dimère d'antigène HBs dont le nombre par particule est estimé à 180, soit 360 protéines de surface par virions correspondant à l'estimation basse de Dryden *et al* (Dryden et al, 2006). La faible densité observée dans l'espace entre l'enveloppe et la nucléocapside des particules compactes et espacées dans lequel on doit retrouver les excroissances de la capsid, les boucles cytoplasmiques du domaine S et le domaine iPre-S de la protéine L, soit environ 60% de l'espace, suggère que les régions cytoplasmiques des protéines de surface s'organisent en une fine couche le long de la face interne de l'enveloppe virale. Globalement, l'analyse montre que l'organisation des dimères d'AgHBs est la même pour toutes les particules bien qu'elle ne soit pas parfaitement superposable (Fig. 17).

Ainsi, à la différence de Dryden *et al*, Stefan Seitz et ses collaborateurs ont réussi à identifier une relation spatiale entre la nucléocapside et l'enveloppe virale dont l'organisation, dictée par la capsid, n'est pas complètement variable mais plutôt basée sur une symétrie icosaédrique bien que l'on puisse observer une variabilité dans l'orientation de chaque projection.

En conclusion, l'enveloppe virale est donc constituée de dimères d'AgHBs, dont l'organisation est basée sur une symétrie icosaédrique comme celle de la capsid du fait de l'interaction électrostatique entre les dimères d'AgHBc et d'AgHBs. L'existence des deux types de virions, compacts et espacés, dont la densité de l'enveloppe ainsi que sa capacité à interagir avec la nucléocapside est différente, n'a pas encore été expliquée, que ce soit d'un point de vue structural ou fonctionnel. Cependant, il semble que le matériel viral le plus infectieux purifié à partir de cultures cellulaires soit constitué quasi exclusivement des particules espacées suggérant le rôle fondamental de ce phénotype.

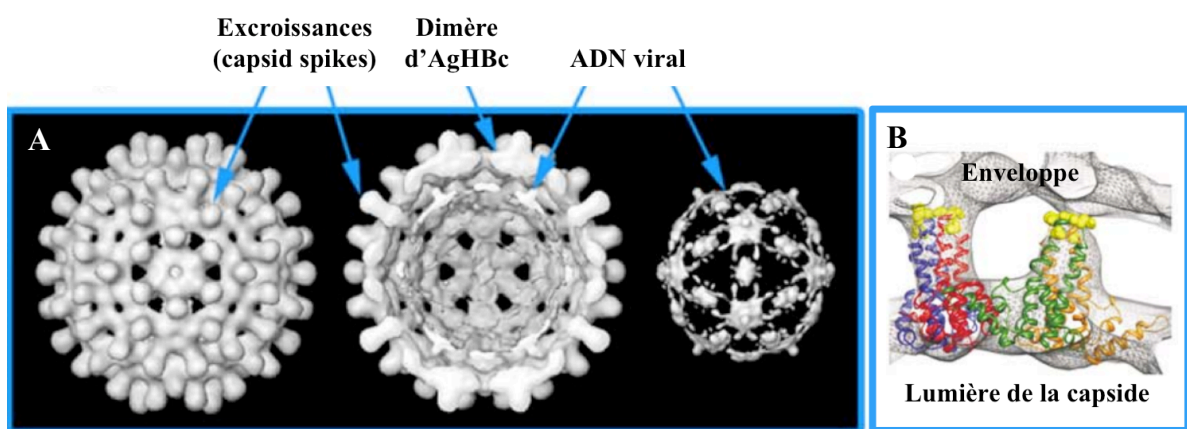
II. Nucléocapside

La protéine core ou antigène HBc est la protéine structurale majeure de la capsid. Cette protéine, de 21 kDa et 183-185 acides aminés selon les génotypes, peut être divisée en 2 régions:

(i) une région N-terminale de 149-151 acides aminés qui possède un motif "leucine zipper" permettant la dimérisation de l'AgHBc et son assemblage en une structure capsidique (Chang et al, 1994; Gallina et al, 1989; Zhou et al, 1992). Les 144 premiers acides aminés de la protéine de capsid (domaine hydrophobe) suffisent à la formation de capsides (Chang et al, 1994; Yang et al, 1994). Cette extrémité de la protéine a été localisée à l'extérieur des capsides par des études de marquage réalisées en microscopie électronique (Conway et al, 1998; Zlotnick et al, 1997).

(ii) une région C-terminale basique de 34 résidus qui contient quatre domaines riches en arginine qui ne sont pas impliqués dans la formation de la nucléocapsid: le premier est nécessaire à l'encapsidation de l'ARN pré-génomique (matrice pour la synthèse de l'ADN viral) associé à la polymérase virale (Hatton et al, 1992; Machida et al, 1991; Nassal, 1992; Yang et al, 1994) alors que les trois autres sont susceptibles d'interagir avec l'ADN viral (Gallina et al, 1989; Hatton et al, 1992; von Weizsacker et al, 1995; Yu & Summers, 1991). Cette extrémité de la protéine a été localisée dans la lumière des capsides par des études de marquage réalisées en microscopie électronique (Conway et al, 1998; Zlotnick et al, 1997).

Les analyses de cryo-microscopie électronique et de cristallographie de la protéine HBc ont permis de démontrer que l'enveloppe des particules virales complètes entourait une capsid de 28 nm (T=3) ou 31 nm (T=4) de diamètre contenant respectivement 180 ou 240 antigènes de



Analyse 3D d'une capside (T=4) contenant une molécule d'ADN viral

Figure 18. **A.** Reconstruction 3D de capsides natives, contenant une molécule d'ADN viral, purifiées à partir de foie de souris transgéniques répliquant le VHB. La structure des capsides purifiées à partir de virions est identique (Dryden et al, 2006). **B.** Représentation de la structure cristallisée des deux dimères de capside « AB » (rouge et bleu) et « CD » (orange et vert) (Wynne et al, 1999) au sein de la reconstruction 3D d'une particule virale complète compacte (Seitz et al, 2007). Les acides aminés chargés négativement au sommet des excroissances, en contact avec l'enveloppe virale, sont représentés en jaune.

capsides organisés en dimères (Bottcher et al, 1997; Conway et al, 1997; Crowther et al, 1994; Dryden et al, 2006; Wynne et al, 1999; Zlotnick et al, 1999). Les deux types de capsides ont une structure tridimensionnelle très proche. Elles adoptent une symétrie icosaédrique dont la triangulation (T), qui correspond au nombre de triangle par face de l'icosaèdre (figure géométrique constituée de 12 sommets et 20 faces), est de 3 ou 4, le nombre de sous-unités constituant une capsidite étant égal à $60T$. A leur surface, les capsides comportent de nombreuses excroissances ainsi que des pores d'un diamètre de 12 et 15 Å, quelle que soit leur taille (Fig. 18A) (Bottcher et al, 1997; Conway et al, 1997; Crowther et al, 1994; Dryden et al, 2006; Zlotnick et al, 1999).

Chaque excroissance correspond à une structure « coiled coil », constituée de 4 hélices α , formée par l'interaction entre les hélices à l'extrémité N-terminale des dimères d'AgHBc (Fig. 18B) (Bottcher et al, 1997; Conway et al, 1997; Wynne et al, 1999). La structure cristallisée à une résolution de 3,3 Å de l'AgHBc (Wynne et al, 1999; Zlotnick et al, 1999) a permis de localiser les différents acides aminés de la protéine dans la structure, notamment ceux situés à l'extrémité des excroissances qui constituent le site antigénique majeur de la capsidite et qui seraient impliqués dans l'interaction avec l'enveloppe virale (Seitz et al, 2007) (Fig. 18B). Selon l'environnement des protéines de capsidite dans la structure, on distingue quatre sous-types de monomères HBc (A, B, C et D) dans la structure $T=4$, s'organisant en deux types de dimères AB et CD (Bottcher et al, 1997; Conway et al, 1997; Wynne et al, 1999; Zlotnick et al, 1999) (Fig. 18B). Les excroissances formées par ces dimères n'interagissent pas tout à fait de la même façon avec l'enveloppe virale. Le dimère AB est capable d'établir deux points de contact avec l'enveloppe des particules compactes de la carte A (Fig. 16) ou un seul avec l'enveloppe des particules compactes et espacées des cartes B et C. Le dimère CD n'établit qu'un seul point de contact avec l'enveloppe virale, quel que soit le type de particule. Il est possible d'imaginer que chaque dimère interagirait avec une région différente des protéines d'enveloppe. Quoiqu'il en soit, le nombre important d'acides aminés chargés négativement à la surface des excroissances (Wynne et al, 1999) suggère que peu importe le dimère impliqué, le contact entre l'enveloppe et la nucléocapsidite se ferait via des liaisons électrostatiques avec des résidus basiques des protéines de surface (Seitz et al, 2007). Cependant, il est important de noter que les résidus supposés importants pour l'enveloppement de la nucléocapsidite ont été identifiés à la base des excroissances d'AgHBc par Ponsel et Bruss en 2003 (Ponsel & Bruss, 2003) et que ces résidus ne semblent pas établir de contacts directs avec l'enveloppe virale dans le modèle proposé par Seitz *et al*, peut être à cause de la résolution trop faible de leur reconstruction ($\approx 22\text{Å}$).

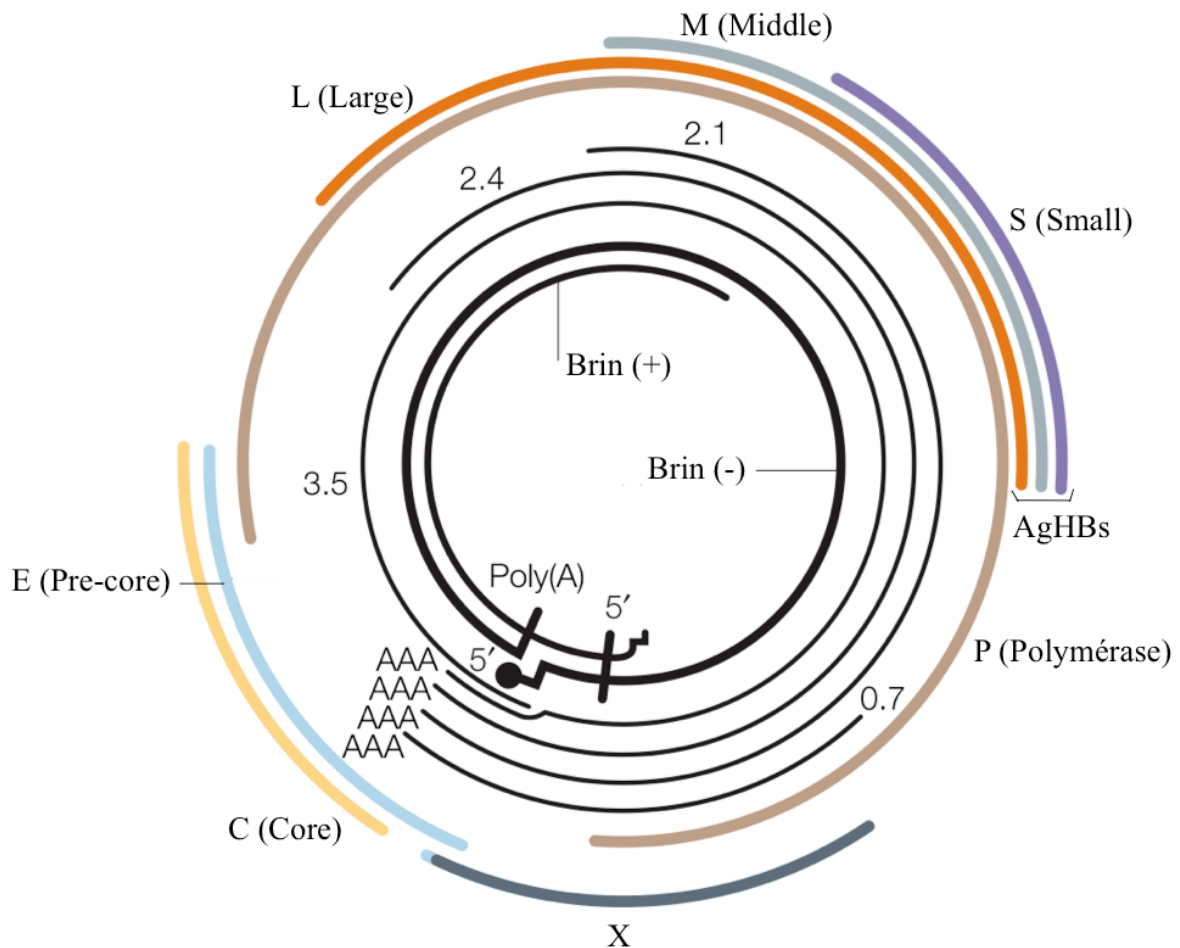


Figure 19. Structure du génome du VHB. Les cercles intérieurs représentent le brin (-) complet de la molécule d'ADN viral et le brin (+) incomplet. Le disque noir à l'extrémité 5' du brin (-) schématise la polymérase virale avec laquelle il interagit via une liaison covalente. Les deux traits verticaux joignant les brins (+) et (-) correspondent aux régions répétées DR1 et DR2. Les courbes fines et noires représentent les ARNs transcrits à partir du génome viral, leur taille est indiquée en Kb. Il existe en fait deux ARNs de 3,5 Kb démarrant avant et après le codon d'initiation de la région pre-core. Les plus courts assurent une double fonction : ils correspondent à l'ADN pré-génomique qui est encapsidé et sert de substrat à la synthèse du brin (-) d'ADN ; ils permettent la traduction de la protéine de capsid (core) et de la polymérase. Les plus long permettent la traduction de la protéine pré-core ou AgHBe. Tous les ARN se terminent au niveau du site unique de polyadénylation (polyA). Les lignes colorées épaisses indiquent la position des cadres ouverts de lecture des protéines virales dont le nom est indiqué à côté. Source : (Rehermann & Nascimbeni, 2005).

Concernant la région C-terminale riche en arginine de la protéine HBc, en contact avec la lumière de la capsid, il est toujours estimé qu'elle permet l'interaction avec le génome viral, bien qu'elle n'ait pas été cristallisée (Gallina et al, 1989; Nassal, 1992; Zlotnick et al, 1997).

III. Génome viral

A. Structure

Le génome du VHB est constitué d'une petite molécule d'ADN de 3215 nucléotides, (Hruska et al, 1977; Robinson & Greenman, 1974; Summers et al, 1975). C'est le plus petit génome de virus animal connu.

Sa structure est partiellement double brin : l'ADN viral consiste en un brin long de polarité négative (-) et de taille constante, qui correspond au brin codant, et en un brin court de polarité positive (+) et de taille variable, qui possède la même polarité que les ARNs messagers viraux (Fig. 19). La portion double brin ne représente que 30 à 85% de la longueur totale du génome (Delius et al, 1983; Summers et al, 1975). La région simple brin peut être complétée expérimentalement par l'activité polymérase endogène du virus, aboutissant à un génome totalement double brin. Au cours de cette réaction, l'extrémité 3' hydroxyle du brin (+) sert d'amorce alors que le brin (-) sert de matrice.

La forme du génome viral retrouvée dans les nucléocapsides est de type relaxée circulaire. Malgré la présence d'une interruption dans le brin (-), la structure circulaire du génome est assurée par l'appariement des extrémités 5' des deux brins sur une longueur de 234 nucléotides (Sattler & Robinson, 1979) (Fig. 19). Cette région cohésive est délimitée par deux séquences directement répétées DR1 et DR2 (direct repeat) de 12 nucléotides, qui jouent un rôle dans la réplication virale.

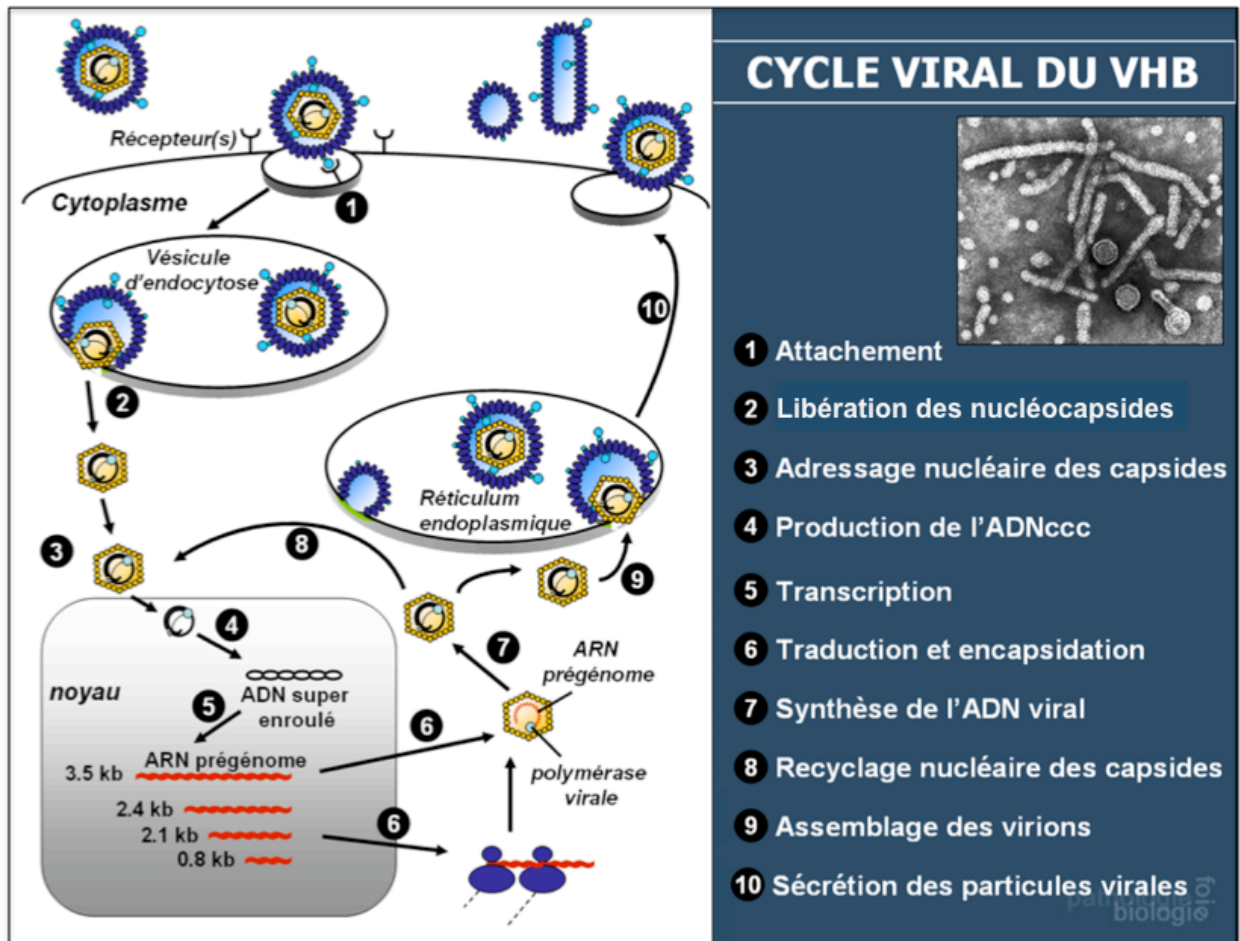
La polymérase virale est liée de façon covalente à l'extrémité 5' du brin (-) (Bosch et al, 1988; Gerlich & Robinson, 1980) (Fig. 19), alors que l'extrémité 5' du brin (+) comporte un oligoribonucléotide servant d'amorce lors de la réplication virale (Lien et al, 1986; Seeger et al, 1986; Will et al, 1987).

B. Organisation génétique

Le clonage de l'ADN présent dans les particules de Dane a permis de déterminer la séquence complète du génome viral en nucléotides (Galibert et al, 1979; Ono et al, 1983). L'analyse de cette séquence a révélé une organisation génétique très compacte où, non seulement tous les nucléotides font partie intégrante d'une région codante, mais aussi où plus de la moitié du génome est traduite dans deux phases de lecture différentes. Le chevauchement des gènes permet ainsi au VHB d'augmenter de 1,5 fois la capacité codante de son génome. Même si

plusieurs phases de lecture ouvertes potentielles existent sur les deux brins, seules quatre régions codantes fonctionnelles ont été mises en évidence sur le brin (-) (Fig. 19):

- la région P, qui s'étend sur 80% du génome, code pour l'ADN polymérase virale ;
- la région Pre-S/S code pour les protéines de l'enveloppe. Cette région comporte plusieurs codons initiateurs de la traduction (ATG) présents dans une même phase ouverte de lecture. Le gène S, délimité en 5' par le troisième ATG, code pour la protéine S. Lorsque la traduction est initiée au second ATG, la protéine M est synthétisée. Cette protéine M comporte donc les régions Pre-S2 et S. Enfin, l'initiation à partir du premier ATG génère la production de la protéine L, constituée des régions Pre-S1, Pre-S2 et S ;
- la région pré-C/C comporte deux codons initiateurs fonctionnels. L'utilisation du premier aboutit à la synthèse d'une protéine non structurale soluble, sécrétée dans le sérum : l'antigène HBe. La traduction à partir du deuxième ATG produit la protéine de structure de la capsid : l'antigène HBc ou protéine C ;
- la région X code pour une protéine régulatrice non structurale : la protéine X.



CYCLE VIRAL DU VHB



- 1 Attachement
- 2 Libération des nucléocapsides
- 3 Adressage nucléaire des capsides
- 4 Production de l'ADNccc
- 5 Transcription
- 6 Traduction et encapsidation
- 7 Synthèse de l'ADN viral
- 8 Recyclage nucléaire des capsides
- 9 Assemblage des virions
- 10 Sécrétion des particules virales

Figure 20. Cycle viral du VHB

CYCLE VIRAL

Le cycle viral des hepadnavirus peut être décomposé en 10 étapes fondamentales (Fig. 20) :

1. **L'attachement** : au moment de l'infection, les virus s'attachent à la surface de la cellule hôte sans doute via un ou plusieurs co-récepteurs membranaires.
2. **La libération des nucléocapsides** : après leur internalisation, les virus libèrent leur nucléocapside dans le cytoplasme.
3. **L'adressage nucléaire et la décapsidation** : les nucléocapsides migrent vers le noyau dans lequel elles libèrent l'ADN viral.
4. **La production de l'ADN superenroulé** : le génome viral relaxé circulaire est complété. Il en résulte un ADN circulaire double brin complet superenroulé (ADNccc).
5. **La transcription** : l'ARN polymérase II cellulaire transcrit un grand nombre de copies du brin (-) de l'ADN superenroulé, dont l'ARN pré-génome.
6. **La traduction** : les transcrits sont transférés dans le cytoplasme où ils sont traduits pour produire les différentes protéines virales.
7. **La production des nucléocapsides et la synthèse de l'ADN viral**: l'ARN pré-génome est encapsidé avec la polymérase virale. A l'intérieur de cette structure, la synthèse de l'ADN viral est initiée. La polymérase, qui possède une activité transcriptase inverse, rétro-transcrit l'ARN en un brin (-) d'ADN. La matrice d'ARN est détruite simultanément par l'activité RNase H de la polymérase. La polymérase virale assure ensuite l'initiation de la synthèse du second brin (+).
8. **Le recyclage des nucléocapsides** : une partie des nucléocapsides peut être recyclée en retournant au noyau afin d'amplifier le nombre de copies d'ADN superenroulé.
9. **L'assemblage des particules virales** : les nucléocapsides nouvellement synthétisées bourgeonnent au niveau des membranes intracellulaires, où elles acquièrent l'enveloppe virale pour former de nouveaux virions. Même en absence de nucléocapside, la membrane contenant les protéines de surface virale bourgeonne spontanément pour former des particules subvirales.
10. **La sécrétion des particules virales** : toutes les particules virales, vides ou complètes, sont sécrétées par la voie constitutive du transport vésiculaire

I. Attachement

La première étape nécessaire à l'établissement d'une infection virale correspond à l'attachement des virus sur une structure accessible à la surface des cellules cibles. Généralement, le processus d'attachement se fait en plusieurs étapes. Dans un premier temps, les

virus interagissent avec une ou plusieurs cibles via des interactions réversibles de faible énergie, puis ils interagissent avec un ou plusieurs récepteurs spécifiques via des interactions de haute affinité permettant d'activer le processus de libération des nucléocapsides dans le cytosol via un mécanisme de fusion ou de translocation à la membrane plasmique ou à la membrane des endosomes.

Les données actuelles ne permettent pas de définir précisément le déroulement des premières étapes de l'infection, c'est-à-dire l'attachement des particules virales à la surface des hépatocytes par l'intermédiaire d'un ou de plusieurs co-récepteurs, la pénétration des virions dans la cellule, la libération des nucléocapsides dans le cytosol, et enfin la pénétration de l'ADN viral dans le noyau. La restriction d'espèce des hepadnavirus ainsi que l'hépatotropisme des virus suggèrent l'existence d'éléments de régulation spécifiques de l'hôte et du foie. Cependant, la transfection d'hépatocytes normaux de rat (Diot et al, 1992) ou d'hépatomes de rat (Shih et al, 1989) par le génome du VHB initie une réplication normale qui aboutit à la sécrétion de virus et de particules subvirales. Cette réplication virale chez une espèce non primate est également retrouvée dans les hépatocytes de souris transgéniques, capables de produire des particules virales complètes (Guidotti et al, 1995; Yamamura et al, 1990). La spécificité d'espèce du VHB ne dépend donc pas de son incapacité à se répliquer chez une autre espèce, mais relève plutôt de son incapacité à infecter les cellules, sans doute par l'absence de récepteurs ou de facteurs nécessaires à l'adsorption adéquate et/ou à l'internalisation du virus. Corroborant cette hypothèse, Philippe Chouteau *et al* ont démontré le rôle de la région Pre-S1 de la protéine L du VHB, impliquée dans le processus d'infection, dans la spécificité d'espèce (Chouteau et al, 2001).

A. Implication des protéines de l'enveloppe virale

Une des approches utilisées pour comprendre le mécanisme d'attachement et de pénétration du VHB consiste à étudier la participation de ses protéines de surface lors de l'infection. La découverte relativement récente de deux modèles d'infection efficaces par le VHB correspondant à la lignée hépatique HepaRG (Gripon et al, 2002) et aux hépatocytes primaires de *Tupaia Belangeri* (Kock et al, 2001; Walter et al, 1996) a permis de rechercher plus facilement la présence de déterminants de l'infectivité dans les protéines d'enveloppe. Ces modèles remplacent aujourd'hui souvent les cultures primaires d'hépatocytes humains (Gripon et al, 1993; Gripon et al, 1988) dont la disponibilité est limitée et dont la susceptibilité à l'infection est variable. Avant la mise en place de ces modèles d'infection, la plupart des données concernaient le modèle du DHBV. Cependant, une transposition absolue des résultats obtenus pour le DHBV au VHB est impossible, à cause de l'existence de divergences relativement

importantes entre ces deux virus. Ce risque d'extrapolation est d'autant plus réel pour l'interaction entre le virus et sa cellule hôte, qu'une disparité notable existe entre les séquences des protéines de surface du VHB et du DHBV (Mandart et al, 1984).

1. Fonctions du domaine Pre-S1

L'importance du domaine Pre-S1 dans l'infection fut suggérée dès 1986 suite à une étude réalisée par Neurath *et al*, démontrant qu'un peptide correspondant aux acides aminés 10 à 36 du domaine Pre-S1 de la protéine L du VHB (génotype D) pouvait se fixer à la surface des cellules HepG2 et inhiber la fixation du VHB sur ces cellules de la même façon que des anticorps dirigés contre ce peptide (Neurath et al, 1986b). Cependant, ce n'est qu'en 1999 que les travaux de Le Seyec *et al* ont démontré clairement la nécessité pour l'infectivité des acides aminés 3 à 77 du domaine Pre-S1 (Le Seyec et al, 1999). Une étude réalisée en 2007 a confirmé ces résultats en utilisant le modèle du VHD. Ce dernier a permis d'analyser la totalité du domaine Pre-S1 au cours de l'infectivité, y compris les régions nécessaires à l'assemblage du VHB, puisque seule la protéine S est importante pour la morphogenèse du virus delta (Blanchet & Sureau, 2007). De façon intéressante, une étude récente a permis de démontrer que le domaine Pre-S1 adoptait une organisation globale non structurée, caractérisée par la présence de plusieurs motifs structurés localisés dans les 40 premiers acides aminés et dont la présence pourrait servir de site de fixation à des récepteurs (Chi et al, 2007). En accord avec cette hypothèse, de nombreuses protéines cellulaires interagissant avec la région N-terminale du domaine Pre-S1 ont été décrites comme récepteur du VHB, bien qu'aujourd'hui aucune n'ait de rôle prouvé au cours de l'entrée virale.

En outre, deux études ont démontré le rôle indispensable, au cours de l'étape d'infection, de l'acide myristique se greffant sur la glycine 2 du domaine Pre-S1 (Bruss et al, 1996b; Gripon et al, 1995).

Un travail réalisé au sein de notre équipe, en collaboration avec Stephan Urban, a permis d'identifier un peptide inhibiteur de l'infection correspondant aux 77 premiers acides aminés du domaine Pre-S1 et incluant l'acide myristique (Gripon et al, 2002). Même des préincubations courtes de ce peptide, ou de peptides plus petits (AA 2-48), avec les cellules suffisent pour bloquer l'infection et rendre les cellules non infectables pendant plusieurs heures, suggérant que les peptides se fixent à la surface d'un récepteur sur les hépatocytes (Glebe et al, 2005; Gripon et al, 2005). Cette hypothèse est supportée par plusieurs expériences : l'attachement spécifique des peptides sur des hépatocytes primaires de Tupaïa mais pas sur des hépatocytes de rat a été mis en évidence par immunohistochimie (Glebe et al, 2005), des peptides marqués par la cyanine 3 se fixent à la surface d'hépatocytes humains en culture primaire (Gripon et al, 2005), la fixation de particules subvirales mixtes contenant les protéines de surface L, M et S sur des hépatocytes primaires de Tupaïa peut être inhibée spécifiquement par la préincubation des cellules avec un

peptide myristoylé dérivé du domaine Pre-S1 du VHB (AA 2-48) alors qu'un peptide myristoylé dérivé du DHBV (AA 2-44) n'a pas d'effet (Glebe et al, 2005). Cependant, l'inhibition de la fixation des particules virales requiert l'utilisation de concentrations importantes de peptide, contrairement à l'inhibition de l'infection, suggérant que l'action des peptides sur le processus d'infection ne passe pas par une diminution de l'adsorption des virus à la surface des hépatocytes. Ces résultats suggèrent l'existence d'une quantité importante de récepteurs de faible affinité pour le VHB à la surface des hépatocytes pouvant être occupés par les peptides (Glebe et al, 2005). Ces récepteurs pourraient correspondre aux protéoglycanes héparane sulfate puisque l'héparine, qui est capable de fixer les virus (Schulze et al, 2007) et d'inhiber leur fixation sur des cellules HepG2 et des hépatocytes primaires (Ying et al, 2002), peut inhiber l'infection *in vitro* (Leistner et al, 2008; Schulze et al, 2007). Cependant, à des concentrations équivalentes, l'héparine peut bloquer complètement l'infection alors qu'elle n'inhibe que de 50 à 70 % l'attachement des virus sur les cellules (Leistner et al, 2008; Schulze et al, 2007). Ainsi, les peptides, comme l'héparine, sont capables de bloquer le processus d'infection à des concentrations pour lesquelles ils ne permettent pas de bloquer l'attachement des virus aux cellules, suggérant que leur action ne passe pas par l'inhibition de l'adsorption des virus à la surface des cellules. L'infection par le DHBV peut aussi être inhibée spécifiquement par un peptide dérivé de l'extrémité N-terminale du domaine Pre-S de sa protéine L. L'inhibition respecte la spécificité d'espèce puisque ce peptide n'inhibe pas l'infection par le VHB (Urban & Gripon, 2002), confirmant l'implication du domaine Pre-S1 dans la spécificité d'hôte du VHB (Chouteau et al, 2001). La présence de l'acide myristique à l'extrémité N-terminale des peptides est cruciale pour obtenir une inhibition efficace de l'infection (Glebe et al, 2005; Gripon et al, 2005), ce qui conforte les données démontrant son importance pour l'infectivité. De plus, les auteurs précédents ont démontré que l'augmentation de la longueur et donc de l'hydrophobicité de la chaîne lipidique associée aux peptides augmentait leur pouvoir inhibiteur. Si le rôle nécessaire de l'acide myristique et du domaine Pre-S1 au cours de l'infection est clairement établi, leur fonction précise lors de l'attachement ou d'une étape ultérieure de l'entrée virale est encore inconnue. De façon intéressante, l'exposition d'un acide myristique après l'étape d'attachement de certains virus non enveloppés est nécessaire à leur mécanisme d'entrée (Hogle, 2002; Liemann et al, 2002).

Les nombreuses données obtenues grâce à la mutagenèse et à la caractérisation des peptides inhibiteurs de l'infection ont permis de cartographier différentes régions du domaine Pre-S1 selon leur importance et leur fonction présumée (Fig. 21) :

- les 7 premiers acides aminés sont indispensables à l'infectivité des virus probablement parce

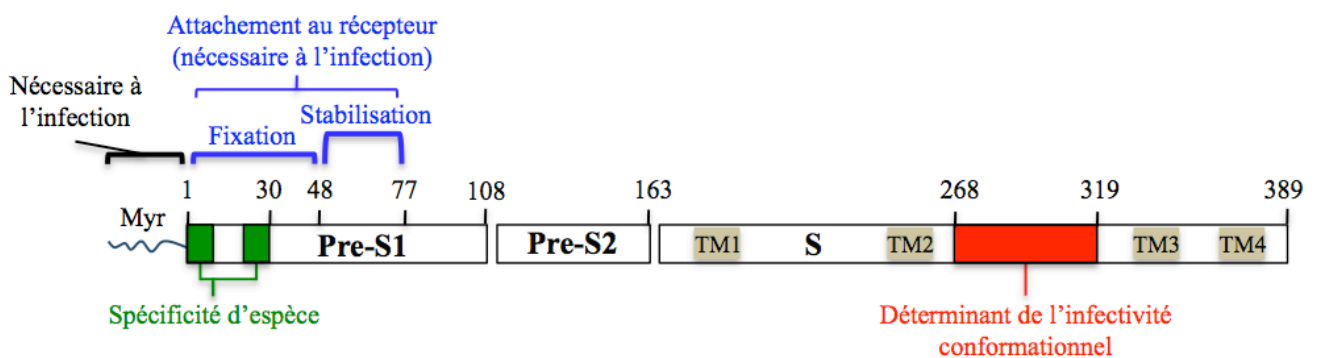


Figure 21. Régions des protéines d'enveloppe nécessaires à l'infection : (i) Myr = Acide myristique (Bruss et al, 1996; Gripon et al, 1995) ; (ii) Régions 1-10 et 21-31 (vert) du domaine Pre-S1 impliquées dans la spécificité d'espèce (Chouteau et al, 2001) ; (iii) Région 1-77 du domaine Pre-S1 (bleu) nécessaire à l'infection (Blanchet & Sureau, 2007; Le Seyec et al, 1999) et probablement impliquée dans l'étape d'attachement (Barrera et al, 2005; Glebe et al, 2005; Gripon et al, 2005) ; (iv) Région 268-319 de la boucle antigénique de la protéine S (rouge) délimitant un motif conformationnel nécessaire à l'étape d'infection (Salisse & Sureau, 2009).

qu'ils sont nécessaires à la myristoylation (Le Seyec et al, 1999).

- les acides aminés 8 à 75 sont indispensables à l'infectivité du VHB et du VHD (Blanchet & Sureau, 2007; Le Seyec et al, 1999).

- Parmi les 75 premiers résidus, les acides aminés 2 à 48 constituent probablement le site de fixation du VHB sur son récepteur (Barrera et al, 2005; Glebe et al, 2005; Gripon et al, 2005). En effet, cette région est indispensable et suffisante pour obtenir une efficacité optimale d'inhibition de l'infection par les peptides dérivés du domaine Pre-S1. Le motif DPAF, correspondant aux acides aminés 20 à 23 de cette région doit jouer un rôle important lors de l'infection des cellules HepaRG car sa délétion dans le peptide PreS/2-48myr (AA 2-48 du domaine Pre-S1 myristoylé) inhibe fortement le pouvoir inhibiteur de ce peptide. Les 18 premiers acides aminés des peptides sont insuffisants pour obtenir une bonne inhibition de l'infection, mais ils sont nécessaires à leur activité. En effet, la séquence 19 à 48 du domaine Pre-S1, myristoylée artificiellement sur la leucine 19, ne bloque pas l'infection des cellules HepaRG. La région 2-18 du domaine Pre-S1 doit donc être impliquée dans la reconnaissance directe du récepteur, ou dans le maintien de la distance entre l'acide myristique et le site de fixation au récepteur (Gripon et al, 2005). Par ailleurs, une étude réalisée avec le modèle du VHD a démontré que la région comprise entre les acides aminés 5 et 20 du domaine Pre-S1 correspondait à la séquence minimale nécessaire pour inhiber l'infection du virus delta, suggérant que ces acides aminés seraient directement impliqués dans l'interaction avec le récepteur du virus (Barrera et al, 2005). Enfin, une étude complémentaire menée par Glebe *et al* et utilisant comme modèle le VHB et les hépatocytes primaires de Tupaïa a permis de compléter et de confirmer la majorité de ces données (Glebe et al, 2005). L'analyse du pouvoir inhibiteur de peptides dont la région C-terminale a été délétée de façon croissante a permis de cartographier les régions importantes pour l'activité des peptides et par extrapolation pour l'infectivité. Alors que le peptide preS/2-48myr présente l'activité inhibitrice la plus forte, les peptides délétés ont une activité de plus en plus faible plus la délétion est grande. Le plus petit peptide, preS/2-8myr, présente une activité inhibitrice très faible mais toujours détectable, et un peptide de 10 acides aminés supplémentaires, preS/2-18myr, est beaucoup plus actif ($\times 30 \approx$) suggérant l'importance des acides aminés 10 à 18. De façon intéressante, l'ajout de 10 autres résidus pour obtenir le peptide preS/2-28myr, n'augmente pas l'activité d'inhibition. Enfin, l'addition des acides aminés 29 à 38, puis 39 à 48, augmente séquentiellement le pouvoir inhibiteur des peptides. Ces données ont donc permis de délimiter deux régions importantes pour bloquer l'infection des hépatocytes de Tupaïa par le VHB : le domaine 2-18, dont les acides aminés 9 à 18 sont les plus importants, et le domaine 29-48. De plus, en accord avec les études de Gripon *et al* et de Barrera *et al*, les 18 premiers acides aminés du domaine Pre-S1 sont indispensables au blocage de l'infection car un peptide myristoylé

comportant les résidus 19 à 48 du domaine Pre-S1 ne présente qu'une très faible activité d'inhibition. Ainsi, parmi les deux séquences interférant avec l'infection, la 2-18 est indispensable et la 29-48 est accessoire (Glebe et al, 2005). Enfin, une étude menée par Engelke *et al* a vérifié que la région 9-18 était essentielle pour l'infectivité des virions et identifié trois acides aminés (11, 12 et 13) dans cette région qui sont cruciaux pour l'inhibition de l'infection. Des virus mutants dont la protéine L est mutée au niveau de ces résidus ne sont pas infectieux (Engelke et al, 2006). Tous ces résultats sont de plus confortés par la forte conservation de la région 9-18 par rapport au reste de la séquence 1-48. Malgré la concordance des résultats de ces études, le motif DPAF (AA 20-23), reconnu par l'anticorps neutralisant anti-Pre-S1 MA18/7, n'est pas important pour l'activité des peptides sur les hépatocytes de Tupaia alors qu'il est important pour le blocage de l'infection sur les cellules de la lignée HepaRG. Pourtant, l'anticorps MA18/7 neutralise l'infection sur les deux types de cellules. Si cette région du domaine Pre-S1 est impliquée dans l'interaction du virus avec son récepteur, on peut imaginer que le récepteur sur les hépatocytes de Tupaia possède des sites de fixation pour les domaines 9-18 et 28-48 comparables à ceux du récepteur humain mais un site de fixation pour le domaine 20-27 différent (Glebe et al, 2005).

- Les acides aminés 49 à 75, bien qu'indispensables à l'infection, ne sont pas nécessaires dans les peptides pour inhiber l'infection et diminuent même leur activité. Ils pourraient être impliqués dans le masquage du site de fixation au récepteur avant l'étape d'attachement, ou permettre la stabilisation de l'interaction entre le virus et son récepteur. Dans le modèle du DHBV, un tel mécanisme d'attachement des virus à leur récepteur, la carboxypeptidase D, en deux étapes, a été mis en évidence. Dans un premier temps, l'interaction des virus avec la carboxypeptidase D, se fait grâce à une hélice α localisée dans la région C-terminale du domaine Pre-S, puis le complexe est stabilisé par une structure localisée dans la région N-terminale du domaine Pre-S (Urban et al, 2000).

- La séquence au delà des 75 premiers résidus ne comporte pas de déterminants de l'infectivité (Blanchet & Sureau, 2007; Le Seyec et al, 1999). Cependant, cette région du domaine Pre-S1, en plus du domaine Pre-S2, pourrait avoir un rôle d'espacement entre l'extrémité N-terminale du domaine Pre-S1 et le premier domaine transmembranaire du domaine S. En effet, Blanchet et Sureau ont observé que des délétions de taille croissante dans cette région inhibaient l'infectivité des virus de façon croissante (Blanchet & Sureau, 2007).

Très récemment, une étude réalisée par Yann Le Duff *et al* a permis d'étudier la complémentarité lors de l'infection entre l'acide myristique, les résidus 2-48 et enfin les résidus 49-75 du domaine Pre-S1. En produisant des virus chimères dont l'enveloppe virale contient des

protéines L différentes, chacune mutée dans une des régions précédentes, ils ont démontré que ces régions devaient se trouver sur une même protéine L afin que les virus conservent leur pouvoir infectieux (Le Duff et al, 2009). Ces résultats illustrent donc la nécessité d'une coopération en *cis* (au sein d'une même protéine), durant le mécanisme d'entrée, entre l'acide myristique et les régions 2-48 et 49-75. En accord avec leurs résultats et avec les données préexistants dans la littérature, les auteurs ont proposé le modèle suivant : les acides aminés 2 à 48 du domaine Pre-S1, possiblement avec l'assistance de l'acide myristique, constitueraient le site de fixation au récepteur à la surface des hépatocytes, et les résidus 49 à 75 d'une même protéine L pourraient soit initier l'interaction avec le récepteur soit la stabiliser. A la différence des régions précédentes du domaine Pre-S1, le déterminant de l'infectivité présent dans la boucle antigénique du domaine S des protéines d'enveloppe (*cf.* chapitre suivant « Fonctions du domaine S », page 52) (Salisse & Sureau, 2009) n'est pas nécessaire, dans la protéine L, pour le processus d'infection (Le Duff et al, 2009). De ce fait, si ce déterminant doit interagir avec le domaine Pre-S1 lors du processus d'entrée, il est probable qu'il interagisse en *trans* avec ce domaine, via la protéine S. Alternativement, il est également possible que ces deux déterminants agissent indépendamment l'un de l'autre lors du processus d'infection. Cette dernière hypothèse est en accord avec des résultats ayant démontré un effet plus important des mutations dans le domaine S lorsqu'elles sont introduites dans la protéine S plutôt que dans la protéine L dont la quantité est très minoritaire dans l'enveloppe virale (Le Duff et al, 2009). De plus, les auteurs de cette étude ont démontré que l'introduction d'une mutation délétère dans le déterminant de la boucle antigénique, dans une proportion de protéine S équivalente au nombre de protéines L estimé par virion, avait le même effet sur l'infectivité que la même mutation lorsqu'elle est introduite dans la protéine L. Ce résultat conforte donc l'hypothèse selon laquelle le déterminant de l'infectivité de la boucle antigénique aurait le même rôle dans les protéines S et L, et que l'effet des mutations dans ce déterminant serait corrélé à la quantité relative des protéines S et L dans l'enveloppe virale.

2. Fonctions du domaine Pre-S2

La protéine M n'est pas nécessaire pour l'infectivité du VHB et du VHD (Fernholz et al, 1993; Santantonio et al, 1992; Sureau et al, 1994) bien que des anticorps dirigés contre le domaine Pre-S2 inhibent l'infection (Glebe et al, 2003; Neurath et al, 1986a). Cependant, le domaine Pre-S2 étant présent à la fois dans les protéines M et L, il est probable que les anticorps anti-Pre-S2 inhibent l'infectivité des virions en bloquant le domaine Pre-S de la protéine L. Cette hypothèse est supportée par l'observation qu'un anticorps (Q19/10) reconnaissant spécifiquement le domaine Pre-S2 glycosylé sur l'asparagine 4 de la protéine M (Fig. 11), induit une inhibition de l'infection modérée comparé aux autres anticorps anti-Pre-S2 qui reconnaissent

les protéines M et L (Glebe et al, 2003). Toutefois, le domaine Pre-S2 de la protéine L ne comporte pas de déterminant de l'infectivité et n'est donc pas nécessaire à l'étape d'entrée du cycle viral (Blanchet & Sureau, 2007; Le Seyec et al, 1998). En 2006, un motif de translocation (TLM), localisé à l'extrémité C-terminale du domaine Pre-S2, a été décrit pour son implication dans la libération des nucléocapsides dans le cytosol (Stoeckl et al, 2006). L'implication de ce motif lors du processus d'infection a ensuite été écartée par trois études (Blanchet & Sureau, 2007; Gudima et al, 2007; Lepere et al, 2007) dont une, réalisée pendant ma thèse, sera présentée dans la partie résultat de ce manuscrit.

3. Fonctions du domaine S

Le fait que la fixation, sur des hépatocytes de Tupaïa, de particules subvirales contenant des protéines L, M et S, puisse être inhibée spécifiquement par des peptides dérivés du domaine Pre-S1, suggère que la protéine S n'est pas impliquée dans l'étape d'attachement (Glebe et al, 2005). De plus, des particules subvirales recombinantes exprimant une protéine de fusion Pre-S1/S, ainsi que des particules subvirales enrichies en domaine Pre-S1 purifiées à partir de sérum, sont capables de se fixer efficacement sur des hépatocytes primaires de Tupaïa (Glebe et al, 2003; Glebe et al, 2005) contrairement à des particules ne contenant que la protéine S (Glebe et al, 2005). Cependant, ces résultats obtenus en utilisant des hépatocytes primaires de Tupaïa ne reflètent peut être pas directement le processus naturel d'infection d'hépatocytes humains par le VHB. En effet, puisqu'il a été suggéré que la reconnaissance du récepteur à la surface des hépatocytes de Tupaïa par le domaine Pre-S1 du VHB pourrait être légèrement différente de la reconnaissance du récepteur des hépatocytes humains (*cf.* chapitre « Fonctions du domaine Pre-S1 », page 47), on peut imaginer que l'attachement du VHB sur des cellules humaines fasse intervenir le domaine S alors que ce dernier n'est pas impliqué dans l'adsorption des virus sur des cellules de Tupaïa.

En accord avec cette dernière hypothèse, plusieurs arguments suggèrent l'implication de la protéine S, ou du domaine S, au cours de l'entrée virale. Premièrement, des anticorps reconnaissant le domaine S, utilisés dans les vaccins, sont capables de neutraliser l'infection *in vitro* et *in vivo* (Glebe et al, 2003; Iwarson et al, 1985; Ogata et al, 1999; Shearer et al, 1998). Deuxièmement, en contradiction avec les études de Glebe *et al*, certaines données suggèrent que la protéine S pourrait être impliquée dans l'étape d'attachement. En 2001, Nir Paran *et al* réussissent à infecter des cellules de la lignée HepG2 cultivées en présence de DMSO dont la présence stimulerait la fixation des particules virales à la surface des cellules. Bien que le domaine Pre-S1 soit le principal élément impliqué dans cet attachement, les auteurs démontrent que des particules ne contenant plus les domaines Pre-S1 et Pre-S2 sont capables d'interagir avec les cellules HepG2. De plus, un peptide dérivé du domaine Pre-S1 (AA 10 à 36), interagissant

avec les cellules HepG2 de la même façon que le domaine Pre-S1 entier, n'inhibe pas complètement la fixation de particules subvirales contenant de la protéine S sur ces cellules, suggérant que la protéine S soit impliquée dans l'attachement des particules virales (Paran et al, 2001). Néanmoins, l'infection des cellules HepG2 n'ayant pas été reproduite par d'autres équipes, la pertinence de ces résultats peut être remise en doute. Une autre étude a démontré récemment, en contradiction avec des résultats suggérant que le VHB interagissait, grâce à son domaine Pre-S1 uniquement, avec des protéoglycanes héparane sulfate (*cf.* chapitre « Implication des protéines cellulaires et autres », page 54) (Leistner et al, 2008; Schulze et al, 2007), que des particules subvirales composées de protéine S uniquement interagissaient aussi bien avec l'héparine que des particules contenant des protéines L (Chai et al, 2008). Ainsi, si les protéoglycanes héparane sulfate sont impliqués dans l'attachement des virus aux hépatocytes comme le suggèrent les études de Glebe *et al*, Leistner *et al*, et Schulze *et al*, ces résultats suggèrent que la protéine S joue un rôle dans cette étape du cycle viral.

Si la fonction précise du domaine S, reste controversée au cours de l'étape d'attachement du VHB, trois études récentes réalisées par l'équipe de Camille Sureau ont permis d'identifier clairement un déterminant de l'infectivité dans la boucle antigénique de ce domaine (Fig. 21) (Abou-Jaoude & Sureau, 2007; Jaoude & Sureau, 2005; Salisse & Sureau, 2009). Une quatrième étude, réalisée par Yann Le Duff *et al* a démontré que ce déterminant était nécessaire au processus d'infection uniquement dans la protéine S, et que sa présence était facultative dans la protéine L probablement du fait de la quantité majoritaire de la protéine S dans l'enveloppe virale (Le Duff et al, 2009). Ce déterminant de l'infectivité est dépendant de la conformation de la boucle antigénique et chevauche en partie le déterminant antigénique (*a*). Il est constitué des 7 cystéines présentes entre les positions 121 et 149 (Abou-Jaoude & Sureau, 2007) et des résidus P105, V106, P108, I110, T118, G119, P120, R122, T123, K141, P142, T148 et W156 (Salisse & Sureau, 2009) (la position 1 correspondant au premier acide aminé du domaine S). Les cystéines jouent un rôle central dans la fonction de ce déterminant de l'infectivité. Leur engagement dans des ponts disulfures, ainsi que l'exposition pour certaines d'un groupement SH libre, est indispensable à l'infectivité du VHD puisque le prétraitement des virus par des agents réducteurs ou des agents alkylants, modifiant respectivement ces deux environnements des cystéines est inhibiteur de l'infection (Abou-Jaoude & Sureau, 2007). Deux hypothèses principales, en accord avec l'ensemble de leurs résultats, ont été formulées par les auteurs quant au rôle de ce nouveau déterminant de l'infectivité :

(i) il pourrait interagir avec un récepteur à la surface des hépatocytes tel que les protéoglycanes héparane sulfate puisque l'étude réalisée par Chai *et al* suggère que la protéine S interagit aussi bien avec l'héparine que le domaine Pre-S1 (Chai et al, 2008). Les résidus chargés

positivement du déterminant (R122 et K141) pourraient interagir avec les charges négatives des héparanes sulfates. Cette hypothèse est également en accord avec les résultats de Nir Paran suggérant le rôle de la protéine S, en plus de celui de la protéine L, dans l'attachement (Paran et al, 2001). L'existence d'un déterminant conformationnel de l'infectivité dans la boucle antigénique de la protéine S est également supportée par l'observation qu'un anticorps monoclonal reconnaissant un épitope conformationnel dans cette boucle est plus inhibiteur de l'infection qu'un anticorps y reconnaissant un épitope linéaire (Glebe et al, 2003).

(ii) les cystéines ainsi que les résidus à leur proximité dans la structure tridimensionnelle de la boucle antigénique pourraient jouer un rôle lors de la libération des nucléocapsides. En effet, les cystéines étant impliquées dans la formation de ponts disulfures consolidant l'enveloppe virale, leur isomérisation pourrait constituer une étape clé dans la réorganisation de l'enveloppe afin de libérer les nucléocapsides dans le cytosol via un mécanisme de fusion ou de translocation. Ainsi, la modification de la structure de la boucle antigénique par des approches génétiques ou biochimiques pourrait inhiber l'infectivité en altérant le réseau de ponts disulfures, par exemple en créant des liaisons illégitimes entre des cystéines pouvant empêcher le désassemblage de l'enveloppe virale. Il est important de noter qu'une activité dissulfide isomérase (détruisant les ponts disulfures) n'est pas requise à la surface des cellules HepaRG pour leur infection par le VHD, puisque leur incubation avec des agents (ne traversant pas la membrane plasmique) réducteurs, alkylants ou des inhibiteurs des protéines dissulfide isomérase ne modifie pas leur susceptibilité à l'infection. Ceci implique donc que la réduction des ponts disulfures de l'enveloppe ait lieu à l'intérieur des cellules ou que l'activité dissulfide isomérase soit portée par les protéines d'enveloppe elle-même. Bien que le motif CXXC (AA 121-124) présent dans la boucle antigénique soit caractéristique du site catalytique des protéines dissulfide isomérase, le fait que ce motif puisse être altéré par des délétions ou des insertions sans modifier l'infectivité du VHD signifie que, si elle existe, l'activité isomérase des protéines d'enveloppe ne dépend pas de cette séquence (Abou-Jaoude & Sureau, 2007).

B. Implication de protéines cellulaires et autres

Depuis les années 80, de nombreuses équipes ont cherché à identifier des molécules interagissant avec les composants moléculaires présents à la surface du virus. Ainsi, un grand nombre de protéines cellulaires et extracellulaires, issues du sérum ou de la matrice extracellulaire, ont été isolées. Même si ces protéines ont souvent été décrites comme le récepteur au VHB, aucune n'a pour le moment été reliée de façon irréfutable à l'infection. Toutefois, leur participation éventuelle au mécanisme d'adressage du virus aux hépatocytes reste

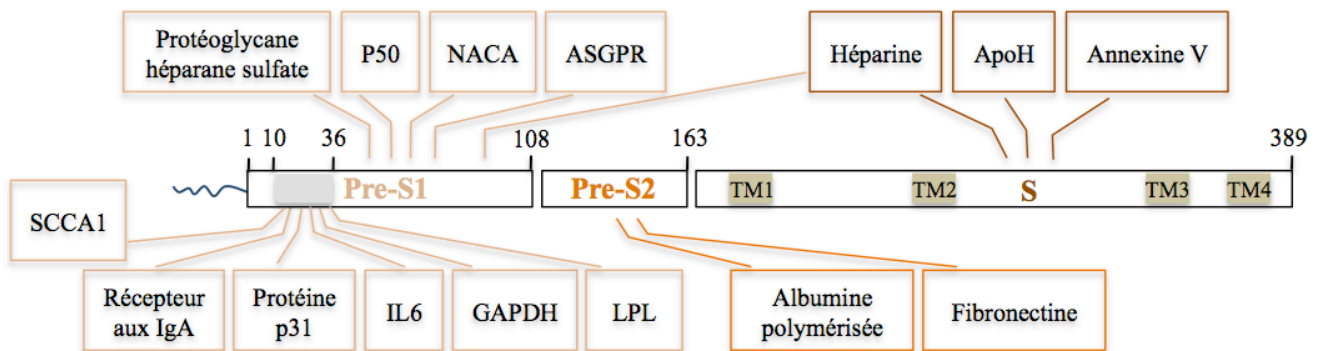


Figure 22. Principaux partenaires protéiques, ou autres, capables d'interagir avec les protéines d'enveloppe du VHB. La région d'interaction est indiquée par le trait reliant chaque partenaire aux protéines d'enveloppe. La région 10-36 du domaine Pre-S1 interagissant avec de nombreuses molécules est représentée par une boîte grise.

possible. Les principaux candidats récepteurs du VHB ainsi que les molécules interagissant avec le virus (Fig. 22) sont regroupés ci-après de la façon suivante :

Région du VHB impliquée dans l'interaction – entité de l'hôte impliquée dans l'interaction

Description de l'interaction.

Pre-S1 (AA10-36) – Cellules HepG2

Un peptide synthétique correspondant aux acides aminés 10 à 36 du domaine Pre-S1 interagit à la surface des cellules HepG2 et inhibe l'attachement du VHB sur ces cellules. L'interaction 'peptide/HepG2' ou 'virus /HepG2' est inhibée par des anticorps dirigés contre le peptide capables de se lier aux virus natifs (Neurath et al, 1986b).

Pre-S1 (AA19-25) – Foie Humain

Des particules subvirales recombinantes contenant le domaine Pre-S1 interagissent avec la membrane plasmique des cellules du foie humain. L'attachement des particules est inhibé par un anticorps monoclonal reconnaissant les acides aminés 19 à 25 du domaine Pre-S1 (Pontisso et al, 1989b).

Pre-S1 (AA10-36) – Récepteur aux Immunoglobulines A (IgA)

- La séquence peptidique entre les résidus 10 et 36 du domaine Pre-S1 possède une forte homologie avec un segment d'une région constante de la chaîne lourde des IgA humaines (Neurath & Strick, 1990).
- Les IgA entrent en compétition avec la fixation du VHB sur des isolats de membranes plasmiques issus de foie humain, suggérant leur attachement sur une molécule membranaire commune présente dans le foie (Pontisso et al, 1992).

Pre-S1 (AA10-36) – Protéine p31

Une glycoprotéine de 34 kDa (31 kDa non glycosylée) a été isolée à partir de cellules HepG2 grâce à son affinité pour un peptide comprenant les AA 10 à 36 du domaine Pre-S1 (Dash et al, 1992).

Pre-S1 (AA10-36) – Interleukine 6 (IL6)

- Un peptide comprenant les acides aminés 10 à 36 du domaine Pre-S1 interagit avec l'IL6 mais pas avec les interleukines 3, 5 et 7 (Neurath et al, 1992b).
- Des cellules CHO transfectées par l'ADNc de l'IL6 acquièrent des sites de fixation pour le peptide 10-36 (Neurath et al, 1992a).

Pre-S1 (AA10-36) – Protéine p44 ≈ Squamous Cell Carcinoma Antigen 1 (SCCA1)

- Une protéine de 44 KDa (HBV-BP) présentant une forte homologie avec SCCA1, qui appartient à la famille des inhibiteurs de sérine protéase, a été isolée grâce à son interaction avec les acides aminés 10 à 36 du domaine Pre-S1. La protéine recombinante HBV-BP ainsi que des anticorps dirigés contre cette protéine inhibent l'attachement et l'internalisation du VHB dans des hépatocytes humains (De Falco et al, 2001).
- Des bio-nanocapsules, composées de protéine L, interagissent avec une protéine recombinante correspondant à SCCA1. Cette dernière inhibe la fixation des nanocapsules sur des cellules hépatiques. La surexpression de SCCA1 dans des hépatocytes de rats transgéniques augmente l'accumulation des bio-nanocapsules dans les hépatocytes (Kasuya et al, 2008).

- Cependant, des formes solubles de SCCA1, ou des anticorps dirigés contre cette protéine, n'inhibent pas l'infection *in vitro* (Gripon, travaux non publiés).

Pre-S1 (AA1-9 ; AA61-79) – Protéine p80 (GRP78/BiP)

- Une protéine de 80 kDa (p80) issue de lysat de cellules HepG2 ou d'hépatocytes humains se fixe de façon spécifique sur des protéines de fusion Pre-S1/GST (Ryu et al, 2000). Deux régions du domaine Pre-S1 cruciales pour l'infection sont indispensables pour l'attachement à p80 : (i) AA 1 à 9, (ii) AA 61 à 79.

- Cette protéine correspond à une protéine chaperon de la famille de HSC70, nommée GRP78 ou BiP. Il semblerait finalement qu'elle soit impliquée dans le processus contrôlant la conformation de la protéine L ou dans l'assemblage des protéines d'enveloppe (Cho et al, 2003).

Pre-S1 – Protéine p35 ou Glycéraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase (GAPDH)

- Une protéine de 35 kDa a été purifiée grâce à des anticorps anti-idiotypique reconnaissant la partie variable d'un anticorps monoclonal dirigée contre les AA 10 à 36 du domaine Pre-S1 (Petit et al, 1992).

- Cette protéine présente des homologies avec la GAPDH (Duclos-Vallee et al, 1998).

Pre-S1/Pre-S2 – Protéine p50 (HBV BF)

La reconnaissance des régions Pre-S par des anticorps monoclonaux est inhibée par une protéine sérique de 50 kDa donnant un marquage membranaire au niveau des hépatocytes sur une coupe de foie humain en immunohistochimie (Budkowska et al, 1993). Cette protéine est une protéase de la famille des métalloprotéinases matricielles qui permet de cliver la protéine M (Budkowska et al, 1997). Cependant, ni la p50, ni l'EDTA, inhibiteurs de ces métalloprotéinases, n'influencent l'efficacité d'infection des hépatocytes humains en cultures primaires (Gripon, travaux non publiés).

Pre-S1 - Nascent Polypeptide-Associated Complex Alpha Polypeptide (NACA)

La protéine NACA a été isolée par un criblage en double hybride entre le domaine Pre-S1 et une banque d'ADNc de foie humain (Li et al, 2005).

Pre-S1/VHB désialylé - Récepteur aux asialoglycoprotéines (ASGPR)

- Le VHB est capable de se lier, via le domaine Pre-S1, à l'ASGPR qui est une lectine spécifique du foie permettant l'internalisation des glycoprotéines désialylées du sang dans les hépatocytes (Treichel et al, 1994).

- Les cellules HepG2 et HuH7 (ASGPR+) sont capables d'internaliser le VHB contrairement aux cellules COS (ASGPR-) (Treichel et al, 1997).

- Le VHB désialylé (déglycosylé) interagit plus fortement avec les cellules HepG2 que le VHB natif mais n'infecte pas ces cellules, il peut être internalisé par des hépatocytes humains en culture primaire (Glebe & Gerlich, 2004).

- Le traitement des virus par des sialidases (appartenant à la famille des glycosylases) augmente l'attachement des virus (désialylés) sur les cellules HepG2 et conduirait à leur infection via l'ASGPR (Owada et al, 2006).

- Cependant, l'asialofetuin, qui est capable de saturer l'ASGPR, n'inhibe pas l'infection d'hépatocytes humains en culture primaire (Gripon, travaux non publiés).

Pre-S1 – Protéoglycane Héparane Sulfate

- Des colonnes d'héparines permettent d'accrocher et de purifier le VHB du sérum humain (Zahn & Allain, 2005).

- L'héparine et le dextran sulfate bloquent la fixation des particules virales à la surface des cellules HepG2 et des hépatocytes humains en culture primaire (Ying et al, 2002).
- L'attachement du VHB sur les cellules de la lignée HepaRG et leur infection peut être inhibée par :
 - (i) des glycosaminoglycanes (GAG) solubles tels que l'héparine et le dextran sulfate,
 - (ii) le traitement des cellules avec du chlorate de sodium qui inhibe la sulfatation des GAGs,
 - (iii) l'élimination des GAGs de la surface des cellules par un traitement enzymatique (Schulze et al, 2007).
- Le clivage de la région Pre-S des particules virales et subvirales par la trypsine inhibe leur fixation sur les colonnes d'héparine, suggérant un rôle du domaine Pre-S et non du domaine S dans l'attachement (Schulze et al, 2007).
- Le degré de sulfatation des GAGs semble jouer un rôle dans le processus d'attachement, ceci permettant peut être au virus de cibler préférentiellement le foie dont les GAGs présentent des particularités de sulfatation (Schulze et al, 2007).
- Le Polyéthylène glycol qui permet d'amplifier l'infection des hépatocytes humains et des cellules HepaRG par le VHB augmente la liaison des particules virales à l'héparine (Schulze et al, 2007).
- Ces données ont été confirmées par l'étude de Leistner *et al* utilisant comme modèle d'infection les hépatocytes primaires de Tupaia (Leistner et al, 2008). Ces auteurs suggèrent l'implication du domaine Pre-S1 et non du domaine S dans l'attachement aux GAGs car leur étude précédente a montré que des particules subvirales, produites dans des levures et composées seulement de protéines S, ne se fixaient pas aux hépatocytes primaires de Tupaia contrairement à des particules subvirales contenant une protéine de fusion S/Pre-S1 qui se comportent comme des particules sériques (Glebe et al, 2005).

Pre-S1/S – Héparine

- Des particules subvirales produites *in vitro* dans des cellules HuH7 constituées soit de protéines S, soit des protéines S et L se lient efficacement et de façon équivalentes à des billes d'héparines. Ces résultats sont en contradiction avec les études de Schulze *et al* et Leistner *et al* (décrites ci-dessus) puisqu'ils suggèrent que la liaison à l'héparine n'est pas dépendante du domaine Pre-S1 mais peut se faire via la protéine S (Chai et al, 2008).
- De plus, l'incapacité de particules subvirales en excès, peu importe leur composition, à inhiber l'infection d'hépatocytes humains en culture primaire, mène les auteurs à remettre en question le rôle de l'héparine comme récepteur nécessaire à la fixation et à l'infection par le VHB (Chai et al, 2008). Cependant, ils n'excluent pas la possibilité selon laquelle l'infection nécessiterait dans un premier temps l'attachement du virus sur les GAGs, puis l'interaction du domaine Pre-S1 avec un récepteur spécifique.

Pre-S1 (AA10-36) - Séquence consensus (WTXWW), Lipoprotéine lipase (LPL)

- Des protéines de fusion exprimant le domaine Pre-S ont été utilisées comme appât pour analyser une banque de phage display composée de peptides aléatoires. Les peptides purifiés interagissant avec la région 10-36 du domaine Pre-S1 présentent la séquence consensus suivante : WTXWW (Deng et al, 2007).
- La recherche de cibles contenant la séquence consensus par alignement de séquence ainsi que l'analyse des propriétés biochimiques des protéines identifiées a permis d'isoler la LPL. Elle est capable de capturer des particules virales issues de sérum humain et d'induire l'attachement du virus sur des cellules l'exprimant à sa surface (Deng et al, 2007).
- De façon intéressante, les protéoglycanes héparane sulfate sont un des récepteurs de la LPL qui pourrait donc y permettre la fixation du VHB. Sa présence à la surface des cellules peut être éliminée par un traitement à l'héparine, elle même capable d'inhiber l'infection par le VHB. Cependant, l'interaction du VHB aux protéoglycanes ne doit

pas passer uniquement par la LPL car des particules subvirales produites *in vitro* par des cellules HuH7 et des levures sont capables de se lier à l'héparine (Chai et al, 2008; Glebe et al, 2005) alors que la LPL est synthétisée dans des tissus extra hépatiques. Néanmoins, elle pourrait participer au transport du virus sur les protéoglycanes présents à la surface des hépatocytes.

Pre-S2 (AA3-15) – Albumine polymérisée

- Il existe à la surface du VHB un site d'attachement à l'albumine polymérisée (Imai et al, 1979; Thung et al, 1989). Ce site est localisé dans la région Pre-S2. La membrane plasmique des cellules de foie humain contient des sites de fixation pour le domaine Pre-S2 du VHB via l'albumine polymérisée (Machida et al, 1983; Pontisso et al, 1989a). Cependant, même si l'albumine se polymérise *in vivo* grâce à l'activité enzymatique des transglutaminases, la forme polymérisée naturellement, mimant celle obtenue par un traitement à la glutaraldéhyde, est très minoritaire par rapport à l'albumine native (Krone et al, 1990), qui inhibe l'attachement de l'albumine polymérisée aux AgHBs (Ishihara et al, 1987) à concentration physiologique.

- Des anticorps monoclonaux reconnaissant les acides aminés 3 à 15 du domaine Pre-S2 inhibent la fixation des virus à l'albumine polymérisée (Sobotta et al, 2000) et inhibent partiellement l'infection d'hépatocytes primaires de Tupaia par le VHB (Glebe et al, 2003).

- Cependant, un excès d'albumine humaine n'inhibe pas l'infection *in vitro* d'hépatocytes humains (Gripon, travaux non publiés).

Pre-S2 (AA1-7) – Fibronectine

Un anticorps anti-idiotype mimant la région N-terminale glycosylée du domaine Pre-S2 de la protéine M (AA 1 à 7) reconnaît la fibronectine présente dans les sinusoides hépatique. Seules des particules subvirales contenant la région Pre-S2 se fixent spécifiquement à la fibronectine (Budkowska et al, 1995).

S – Apolipoprotéine H (ApoH)

L'apolipoprotéine H interagit avec différents types de particules subvirales, qu'elles soient issues de sérum ou produites *in vitro*. Le domaine S des protéines de l'enveloppe serait responsable de cette interaction spécifique qui est inhibée par un anticorps anti-HBs. L'hypothèse de la participation de l'ApoH au cours de l'infection consiste à supposer que le virus s'attache à l'ApoH présente à la surface des particules lipoprotéiques du sérum et que le complexe est ensuite capturé par les hépatocytes dans le cadre du métabolisme des lipides (Mehdi et al, 1994).

S – Annexine V (ou Endonexine II)

- L'annexine V, qui est une protéine capable de fixer les phospholipides, interagit avec des particules subvirales exclusivement constituées de protéines S. L'annexine V de rat ne lie pas les particules subvirales, et n'inhibe pas leur interaction avec des hépatocytes humains, contrairement à l'annexine V humaine suggérant que l'interaction est spécifique d'espèce (Hertogs et al, 1993).

- La surexpression d'annexine V humaine dans des cellules d'hépatome de rat rend ces cellules susceptibles à l'infection par le VHB (Gong et al, 1999).

- Cependant, l'affinité de liaison de l'annexine V et de l'Apo H pour les particules subvirales serait due, non pas à une reconnaissance spécifique de la région S, mais plutôt à leur affinité connue pour les molécules lipidiques (Neurath & Strick, 1994). En effet, ces deux candidats perdent leur propriété de liaison aux AgHBs, si ces derniers

sont préalablement débarrassés de leurs lipides. Par ailleurs, des fragments Fab d'anticorps anti-HBs n'inhibent pas la fixation des particules subvirales sur l'annexine V ou sur l'Apo H.

AgHBs – Récepteur à la transferrine

Les lymphocytes T cytotoxiques peuvent capturer grâce à leur récepteur à la transferrine des AgHBs extracellulaires liés à la transferrine soluble (Franco et al, 1992; Gagliardi et al, 1994). Cependant, un excès de transferrine ou d'anticorps dirigés contre la transferrine ou son récepteur, n'a aucun effet sur l'efficacité d'infection (Gripon, travaux non publiés).

Jusqu'à ce jour, hormis pour les héparanes sulfates, la fonctionnalité de l'attachement du virus aux molécules citées ci-dessus, lors de l'infection, n'a pas été démontrée. Afin d'infirmier ou de confirmer l'implication réelle de ces protéines (ou autres) au cours du processus d'infection, des anticorps dirigés contre ces récepteurs potentiels ou un excès de leur forme soluble, doivent être testés pour leur capacité à neutraliser l'infection. Par ailleurs, une autre piste intéressante pour identifier le récepteur du VHB concerne la restriction de l'infection du virus à des cellules hautement différenciées. Notamment, seules les cellules HepaRG différenciées en présence de DMSO sont susceptibles à l'infection alors que les mêmes cellules non différenciées ne peuvent pas être infectées (Gripon et al, 2002). Bien que la différenciation de ces cellules n'augmente pas leur capacité de fixation du virus (Glebe & Urban, 2007), on peut imaginer que le mécanisme d'entrée du virus puisse dépendre de récepteurs différents dont certains sont présents sur les cellules non différenciées et que la différenciation permette l'expression de tous les récepteurs nécessaires à l'infection, expliquant que bien qu'aucune différence d'attachement ne soit observée, seules les cellules différenciées puissent être infectées.

C. Attachement du DHBV

L'enveloppe virale du DHBV est constituée de deux protéines d'enveloppe, la protéine S (17 KDa) et la protéine L (35 KDa). Comme pour le VHB, la protéine L est myristoylée sur la position 2 de son domaine Pre-S. Contrairement au VHB, ce dernier est en plus phosphorylé, principalement sur la sérine 118 (Borel et al, 1998; Grgacic & Anderson, 1994; Rothmann et al, 1998). Aucune de ces modifications n'est nécessaire aux processus de sécrétion et d'assemblage. Cependant, alors que la mutation dans les sites de phosphorylation n'inhibe pas l'infectivité (Grgacic et al, 1998), la suppression du site de myristoylation génère des mutants non infectieux (Macrae et al, 1991).

Le rôle du domaine Pre-S de la protéine L du DHBV au cours de l'entrée virale a d'abord été démontré par des expériences de compétition de l'infection entre le virus et des particules subvirales. En effet, ces expériences ont montré que l'infection des hépatocytes primaires de

canard par le DHBV pouvait être inhibée par des particules subvirales composées de protéine L et non par des particules composées de protéine S (Klingmuller & Schaller, 1993). De plus, seules les particules contenant le domaine Pre-S interagissent avec les hépatocytes.

Par la suite, Kuroki *et al*, ont identifié une protéine membranaire de 180 KDa qui est immunoprécipitée avec les particules virales du DHBV (Kuroki et al, 1994). Ils ont démontré que l'interaction entre cette protéine et les particules virales se faisait via le domaine Pre-S uniquement et qu'elle pouvait être inhibée spécifiquement par des anticorps neutralisants anti-PreS. La poursuite de ces travaux a permis de déterminer la nature de la gp180 ou p170 (pour la forme non glycosylée). Il s'agit d'une carboxypeptidase résidente de l'appareil trans-Golgi appelée carboxypeptidase D (CPD) (Kuroki et al, 1995; Tong et al, 1995). La CPD de canard (dCPD), comme les autres carboxypeptidases D identifiées aujourd'hui, est constituée de : (i) trois domaines extracellulaires (A, B et C) homologues aux carboxypeptidases E qui sont aussi exposées dans la lumière de l'appareil de Golgi, (ii) d'un domaine transmembranaire, et (iii) d'une région C-terminale cytoplasmique hautement conservée nécessaire au maintien de la protéine dans le réseau trans-Golgien (Eng et al, 1999; Kuroki et al, 1995). Le domaine C, situé à proximité de la région transmembranaire de la CPD et ne possédant pas d'activité enzymatique, est responsable de l'interaction de très haute affinité avec le DHBV (Kuroki et al, 1995; Spangenberg et al, 2001; Urban, 2004; Urban et al, 2000). Cependant, malgré son homologie avec le domaine C de la dCPD, le domaine C des CPD humaines et murines n'interagit pas avec le domaine Pre-S du DHBV (Ishikawa et al, 1998). De façon intéressante, Spangenberg *et al* ont démontré que l'introduction d'une région N-terminale du domaine C de la dCPD dans le domaine C de la CPD humaine permettait à cette dernière d'interagir avec le domaine Pre-S du DHBV, suggérant ainsi le rôle de la CPD dans la spécificité d'espèce des hepadnavirus (Spangenberg et al, 2001). La région du domaine Pre-S impliquée dans l'interaction avec la dCPD a été identifiée grâce à l'utilisation de peptides dérivés du domaine Pre-S capables d'inhiber l'infection *in vitro* par le DHBV. L'utilisation de tels peptides, délétés aux extrémités ou en position interne, a permis de localiser la région nécessaire à l'inhibition de l'infection entre les résidus 30 et 115 du domaine Pre-S. Ensuite, la corrélation étroite entre la capacité des peptides à inhiber l'infection et leur capacité à lier la dCPD a permis de déduire que la région 30-115 du domaine Pre-S bloquait l'infection en ciblant la dCPD à la surface des hépatocytes (Breiner et al, 1998; Urban et al, 1998). Les nombreuses études menées pour identifier la région minimale du domaine Pre-S nécessaire à la fixation de la CPD ont permis de délimiter cette région entre les résidus 87 et 115 (Breiner et al, 1998; Ishikawa et al, 1994; Tong et al, 1995; Urban et al, 1999; Urban et al, 2000). La séquence en position N-terminale de cette région, entre les acides aminés 30 et 86 contribue à la stabilité de l'interaction entre le domaine Pre-S et la

CPD, et permet ainsi la mise en place d'une interaction extrêmement stable entre les deux molécules (Urban et al, 2000).

De façon intéressante, un peptide correspondant au domaine Pre-S du HHBV (virus du Héron), dont la séquence diffère d'environ 50 % de celle du domaine Pre-S du DHBV, est capable de bloquer l'infection par le DHBV en interagissant avec la dCPD et ce malgré la spécificité d'espèce observée entre ces deux avihepadnavirus. Ainsi, si l'incapacité d'attachement des avihepadnavirus à une CPD mammalienne peut expliquer leur incapacité à infecter les mammifères, leur attachement à ce récepteur ne peut expliquer la spécificité d'espèce observée entre les avihepadnavirus (Urban et al, 1998). Dans une étude ultérieure, Urban et Gripon ont démontré qu'un peptide myristoylé dérivé de la région N-terminale du domaine Pre-S1 (AA 2-41) de la protéine L du DHBV, chevauchant la région impliquée dans la spécificité d'hôte entre le DHBV et le HHBV (AA 22-37) (Ishikawa & Ganem, 1995) mais n'incluant pas le site de fixation à la CPD, était capable d'inhiber spécifiquement l'infection d'hépatocytes primaires de canard par le DHBV (Urban & Gripon, 2002). De façon surprenante, alors qu'un peptide équivalent humain ne bloque pas l'infection par le DHBV comme cela était anticipé, un peptide dérivé du domaine Pre-S du HHBV l'inhibe fortement. Malgré ces résultats, puisque la région du domaine Pre-S qui est nécessaire à l'inhibition de l'infection par ces peptides correspond à la région impliquée dans la spécificité d'espèce entre le DHBV et le HHBV, les auteurs suggèrent que l'étape du cycle viral ciblée par les peptides est celle impliquée dans la spécificité d'hôte entre les virus. Le fait que le domaine Pre-S du HHBV permette d'inhiber l'infection d'hépatocytes primaires par le DHBV, signifie qu'il peut, comme le domaine Pre-S du DHBV, interagir avec un récepteur (autre que la CPD) sur les hépatocytes de canard. Ainsi, si la fixation sur ce récepteur ne détermine pas la spécificité d'espèce entre le DHBV et le HHBV, l'incapacité du second à infecter les hépatocytes de canard doit être associée à une étape ultérieure à l'attachement des virus sur ce récepteur telle qu'un clivage protéolytique ou un changement de conformation (Urban & Gripon, 2002). Par ailleurs, des anticorps reconnaissant la région 12-23 des peptides dérivés de l'extrémité N-terminale du domaine Pre-S sont capables d'inhiber l'infection par le DHBV sans affecter la liaison avec la CPD, et d'immunoprécipiter les particules virales, démontrant le rôle crucial de cette région lors de l'infection et son exposition à la surface des virions (Schmut, 2006).

En conclusion, les données concernant l'étape d'attachement du DHBV sont beaucoup plus complètes que celles concernant le VHB. Notamment, l'identification de la dCPD comme récepteur de haute affinité pour le DHBV constitue une découverte majeure dans la compréhension de l'entrée virale de ce virus. De nombreux résultats ont permis de valider cette protéine cellulaire comme candidat récepteur :

1. Des peptides dérivés du domaine Pre-S capables d'interagir avec la dCPD inhibent l'infection des hépatocytes primaires de canard par le DHBV (Breiner et al, 1998; Urban et al, 1998).

2. La forme soluble de la dCPD, ainsi que des anticorps dirigés contre cette protéine, bloquent l'infection par le DHBV (Ishikawa et al, 1998; Urban et al, 2000).

3. Alors que la transduction de la dCPD sauvage dans des hépatocytes primaires de canard augmente le niveau d'infection, la transduction d'un mutant de la dCPD, dont l'endocytose est inhibée, abolit l'infection par le DHBV dans les cellules transduites, suggérant que l'endocytose du DHBV via l'internalisation de la dCPD est nécessaire à l'infection (Breiner & Schaller, 2000). La transduction de récepteurs mutants dont le transport vers les lysosomes est augmenté par rapport au récepteur sauvage est également défavorable pour l'infection, signifiant que les virus doivent être transportés dans les endosomes lors du processus d'infection mais pas au delà.

4. La dCPD est sous exprimée dans les cellules infectées suite à l'expression des protéines de l'enveloppe virale, ce qui permettrait d'empêcher la superinfection des hépatocytes par le DHBV (Breiner et al, 2001).

5. Des mutants du DHBV porteurs de mutations uniques empêchant leur fixation à la dCPD ne sont pas infectieux (Glebe & Urban, 2007).

Cependant, la dCPD n'est probablement pas le seul récepteur du DHBV puisque la transfection de cellules non susceptibles à l'infection, capables de répliquer le génome viral, par un vecteur d'expression de cette protéine ne permet pas d'infecter les cellules transfectées (Breiner et al, 1998). Ces résultats sont cohérents avec les données de Urban et Gripon qui ont identifié des peptides, correspondant à l'extrémité N-terminale du domaine Pre-S1, capables d'inhiber l'infection par le DHBV probablement en se fixant sur un récepteur des hépatocytes autre que la dCPD (Urban & Gripon, 2002). Ainsi, la fonction précise de la dCPD au cours de l'entrée virale est encore inconnue ainsi que le moment et le lieu auquel elle intervient, soit à la surface des cellules pour fixer les virus, soit à l'intérieur des cellules pour induire la libération des nucléocapsides dans le cytosol.

Après l'identification de la carboxypeptidase D comme récepteur du DHBV, Li *et al* ont identifié une protéine de 120 kDa (p120) correspondant à la sous-unité P de la glycine décarboxylase (GDC), retrouvée préférentiellement dans le foie, le pancréas et les reins, et qui est capable d'interagir avec le domaine Pre-S du DHBV lorsque ce dernier est clivé en position C- ou N-terminale (Li et al, 1999; Li et al, 1996). L'inactivation de cette protéine, qui a été localisée en partie à la surface des cellules, dans des hépatocytes primaires de canard grâce à des ARNs interférents diminue leur susceptibilité à l'infection. De ce fait, il a été suggéré que la p120 pourrait agir comme un cofacteur nécessaire à l'infection du DHBV après le clivage

protéolytique de la protéine L (Li et al, 2004). Toutefois, son rôle lors de l'infection par le DHBV n'est probablement pas indispensable car un virus mutant incapable d'interagir avec cette protéine demeure complètement infectieux (Schmut, 2006).

Pour conclure, jusqu'à aujourd'hui, aucun rôle n'a été attribué à la protéine S des protéines d'enveloppe du DHBV au cours de l'entrée virale contrairement à ce qui a été démontré pour le VHB (Salisse & Sureau, 2009). Cependant, le déterminant de l'infectivité identifié dans le domaine S des protéines d'enveloppe du VHB, qui pourrait être impliqué dans l'étape d'attachement, étant localisé dans la boucle antigénique, ce résultat n'est pas surprenant car la protéine S du DHBV, plus petite que celle du VHB, ne possède pas d'homologie de séquence avec le VHB dans la région de la boucle antigénique (Glebe & Urban, 2007).

II. Libération des nucléocapsides

A. Compartiment cellulaire

1. Cas du DHBV

Bien que l'infection des hépatocytes primaires de canard par le DHBV soit très efficace si l'on considère le nombre de cellules infectées dans une culture ($\approx 100\%$), les connaissances sur le mode d'internalisation des particules virales et leur trafic à l'intérieur des cellules avant la libération des nucléocapsides sont limitées. On peut citer trois raisons majeures pour expliquer les nombreux points d'interrogation ayant toujours trait à cette étape du cycle viral : (i) les hépatocytes primaires ne peuvent pas être transfectés efficacement, rendant les études utilisant des dominants négatifs de protéines impliquées dans le trafic intracellulaire difficiles ; (ii) la quantité de virus internalisée dans les cellules infectées est très faible même lorsque le nombre de virus par cellule (multiplicité d'infection) est très élevé au moment de l'infection. Ainsi, l'observation de la voie d'internalisation empruntée par les virus dans les hépatocytes requiert des méthodes de microscopie à fluorescence très sensibles (Chojnacki et al, 2005) ; (iii) compte tenu des limites précédentes, de nombreuses études sont réalisées en utilisant des drogues interférant avec l'acidification des endosomes et le trafic vésiculaire. Ainsi, selon le protocole (dose, durée d'incubation, modèle cellulaire) et les drogues utilisées, les conclusions issues de ces études sont parfois différentes et contradictoires (Offensperger et al, 1991; Rigg & Schaller, 1992). Cependant, la majorité des résultats concernant le trafic intracellulaire des virus a été obtenue grâce à l'utilisation de ces drogues. Les principales molécules utilisées dans les différentes études ainsi que leurs fonctions sont résumées ci-dessous :

➤ Le chlorure d'ammonium (NH_4Cl) et la chloroquine sont deux bases faibles lysosomotropiques qui perturbent le gradient de pH entre le cytoplasme et les endosomes et lysosomes. Elles permettent ainsi l'augmentation du pH dans ces compartiments.

➤ La monensine est un agent lysosomotropique qui bloque l'acidification des endosomes et le transport intracellulaire des protéines. C'est un ionophore pouvant former des complexes avec les ions sodium et les protons.

➤ La bafilomycine A1 et la concanamycine A sont des inhibiteurs des v-ATPase (vacuolar type ATPase) qui sont des pompes à protons capables de créer un gradient de protons entre deux compartiments, en hydrolysant de l'ATP. Ces dernières sont présentes dans la membrane des vésicules d'exocytose et d'endocytose, dans celle des lysosomes, des endosomes et des vésicules de l'appareil de Golgi. Elles maintiennent un pH acide dans ces compartiments. L'inhibition de leur fonctionnement engendre non seulement un problème d'acidification dans les compartiments concernés mais également un blocage de la formation et de la maturation des vésicules de transport endosomales à partir des endosomes précoces (Clague et al, 1994; Yoshimori et al, 1991), bloquant ainsi le transport vers les endosomes tardifs.

➤ La bréfeldine A est un antibiotique, produit par des champignons, qui présente une activité anti-virale. Elle interfère avec le transfert des protéines entre le RE et l'appareil de Golgi en inhibant le transport vers l'appareil de Golgi, ce qui aboutit à l'accumulation des protéines dans le RE. Elle cible un facteur d'échange du GTP dont l'activité est nécessaire à la formation des vésicules de transport entre certains compartiments cellulaires (Lippincott-Schwartz et al, 1991).

➤ La wortmannine est un inhibiteur irréversible des phosphatidyl-inositol-3-kinases (PI-3K) qui sont des kinases cellulaires, phosphorylant des lipides, impliquées dans le trafic vésiculaire. Les vésicules d'endocytose formées après invagination de la membrane plasmique sont dirigées vers des endosomes précoces avec lesquels elles fusionnent. Dans ces compartiments s'effectue un tri sélectif entre les molécules qui seront dégradées et adressées aux endosomes tardifs, et celles qui seront recyclées vers la membrane plasmique directement ou via des endosomes de recyclage. Les inhibiteurs des PI-3K tels que la wortmannine (peu spécifique) inhibent le recyclage depuis les endosomes précoces et également le trafic entre les endosomes tardifs et les lysosomes (Reaves et al, 1996).

➤ Le nocodazole est une drogue qui inhibe la polymérisation des microtubules. Elle inhibe donc le transport vésiculaire dépendant des microtubules et provoque notamment l'accumulation de matériel entre les endosomes précoces et les endosomes tardifs, dans des vésicules de transport entre ces deux compartiments (Bayer et al, 1998).

L'utilisation des agents lysosomotropiques (NH₄Cl, Chloroquine et Monensine) a conduit dans un premier temps à l'obtention de résultats contradictoires quant au rôle du pH dans l'entrée du DHBV. En effet, tandis que Offensperger *et al* observaient un effet inhibiteur de ces

agents sur l'infection, suggérant que l'acidification des endosomes était nécessaire à l'entrée virale (Offensperger et al, 1991), Rigg et Schaller démontraient le contraire (Rigg & Schaller, 1992). Cependant, il est important de noter que dans l'étude de Offensperger *et al*, les cellules étaient traitées pendant plusieurs jours par les drogues conduisant probablement à des effets non spécifiques et indirects comme cela a été démontré ensuite par Kock *et al* (Kock et al, 1996a). En effet, ces derniers ont observé d'une part que l'infection par le DHBV n'était pas inhibée par le NH₄Cl et donc était indépendante de l'acidification des endosomes, et d'autre part que le traitement prolongé des hépatocytes par cette drogue diminuait progressivement leur capacité de réplication du génome viral. L'entrée du DHBV étant indépendante du pH, les auteurs ont voulu déterminer si l'endocytose des particules virales était nécessaire pour qu'elles libèrent leur nucléocapside. L'endocytose est un mécanisme actif nécessitant de l'énergie, dépendant de l'ATP, qui peut être bloqué par des inhibiteurs de la synthèse de l'ATP tels que l'azide de sodium. Ils ont donc testé l'effet de la déplétion en énergie sur l'infection par le DHBV en traitant des hépatocytes primaires de canard par cette drogue. Leurs résultats suggèrent que l'infection nécessite l'endocytose des virus contrairement à ce qui est observé pour un virus contrôlant la fusion à la membrane plasmique même en présence de la drogue, excluant ainsi un effet toxique et non spécifique de cette dernière (Kock et al, 1996a). L'hypothèse d'une entrée virale indépendante de l'acidification des endosomes mais dépendante de l'endocytose proposée par ces auteurs est originale par rapport aux mécanismes d'entrée connus d'autres virus (Harrison, 2008; Kielian & Rey, 2006), cependant une étude récente menée par Funk *et al* a conduit à la même conclusion (Funk et al, 2006). Dans un premier temps, ces auteurs ont démontré en 2004, que l'infection par le DHBV était initiée par l'attachement d'un petit nombre de virus (≈ 10 par cellule) à la surface des hépatocytes même lorsque la quantité de virus utilisée permet de fixer en théorie plus de 1000 virus par cellule. Dans un deuxième temps ils ont démontré que les particules subvirales se fixaient également spécifiquement aux hépatocytes comme les virions et qu'il y avait environ 1×10^4 sites de fixation par cellule pour l'ensemble des particules virales, suggérant que le nombre de récepteurs à la surface des hépatocytes est limité (Funk et al, 2004). Ensuite ils ont démontré que l'internalisation des virus fixés se faisait en moins de 3 heures. Puisque l'ADNccc n'est retrouvé dans le noyau des cellules infectées que 20 heures après l'étape d'attachement (Kock & Schlicht, 1993), et que 3 heures suffisent à l'internalisation des virus fixés, les auteurs ont suggéré que la durée du trafic intracellulaire des virus permettant la libération de l'ADN viral (ADNrc) dans le noyau, devait être de plusieurs heures, ce qui est très long par rapport à des cinétiques d'entrée connues d'autres virus. Enfin, ils ont démontré que le succès de l'infection nécessitait un transport vésiculaire des virus dépendant des microtubules et indépendant des microfilaments d'actine (Funk et al, 2004). Dans leur étude

de 2006, la même équipe a testé l'effet de nombreuses drogues sur l'infection d'hépatocytes primaires par le DHBV afin de compléter ces résultats (Funk et al, 2006). Les données qu'ils ont obtenues ainsi que leurs conclusions sont résumées ci-dessous :

- Les agents lysosomotropiques tels que le NH_4Cl et la Monensine n'inhibent pas l'infection.
→ L'entrée du DHBV semble indépendante de l'acidification des endosomes.
- Après avoir incubé les virus sur les cellules à 4°C pour permettre leur attachement, les auteurs ont remis les cellules en culture à 37°C pendant différents temps avant de réaliser un fractionnement subcellulaire afin de localiser l'ADN viral dans la cellule.
 - 3 heures après le passage à 37°C , 100 % des virus (ADN viral) sont présents dans les endosomes.
 - 6 heures après le passage à 37°C , quelques molécules d'ADN viral sont retrouvées dans le cytoplasme mais la majorité reste dans les endosomes.
 - 9 heures après le passage à 37°C , la quantité d'ADN viral dans le cytoplasme est en augmentation. La quantité totale d'ADN viral dans les cellules augmente toujours proportionnellement au temps d'incubation à 37°C avec les virus signifiant que ces derniers continuent à être internalisés. De façon intéressante, la protéine L contrairement à l'ADN viral, n'est retrouvée que dans les endosomes, peu importe le moment de l'analyse. De plus, sa quantité globale diminue entre 6 heures et 9 heures d'incubation, suggérant qu'après son accumulation dans les endosomes entre 3 et 6 heures, elle est transportée dans un compartiment cellulaire ou elle est dégradée. L'ADN viral, par contre, n'est pas dégradé dans cette fenêtre de temps. Des études de microscopie électronique sur les fractions endosomales 9 heures après la fixation des virus ont permis d'observer des particules virales intactes à l'intérieur des vésicules endosomales et des structures plus petites, sans enveloppe, correspondant probablement à des nucléocapsides nues. Les endosomes contenant les particules virales peuvent être immunoprécipités avec des anticorps dirigés contre la protéine Rab5 dont la présence est caractéristique des endosomes précoces.
- La wortmannine n'inhibe pas l'infection par le DHBV. Cette drogue inhibe, entre autre, le transport entre les endosomes et les lysosomes.
 - La libération des nucléocapsides dans le cytoplasme ne nécessiterait donc pas le transit des virus par les lysosomes.
- La bréfeldine A qui désorganise l'appareil de Golgi et inhibe également le trafic entre les endosomes et les lysosomes, n'inhibe pas l'infection par le DHBV.
 - Le transport des virus vers l'appareil de Golgi n'est pas nécessaire à l'infection.
- La bafilomycine A1 et la concanamycine A, qui bloquent le transport vésiculaire à partir des endosomes précoces ainsi que leur acidification, inhibent l'infection par le DHBV

avant la libération de l'ADN viral dans le noyau. De plus, le traitement par la bafilomycine A1 engendre l'accumulation de protéine L et d'ADN viral, donc de virus, dans les endosomes.

→ Puisque l'acidification des endosomes n'est pas nécessaire à l'infection, l'action de ces drogues doit passer par l'inhibition du transport vésiculaire. Ainsi, l'infection par le DHBV nécessiterait un transport vésiculaire des virus, à partir des endosomes précoces, dépendant de l'activité des V-ATPase.

- Le nocodazole, qui bloque le transport entre les endosomes précoces et tardifs, inhibe l'infection par le DHBV et provoque l'accumulation de virus dans la fraction endosomale.

→ La libération des nucléocapsides du DHBV nécessite un transport vésiculaire entre les endosomes.

- La bafilomycine A1, en bloquant le fonctionnement des v-ATPase, inhibe l'import de protons dans les endosomes et en conséquence modifie le potentiel électrique de la membrane des endosomes (Sonawane et al, 2002). Afin de déterminer si la perturbation de ce paramètre est importante pour l'infection, en plus de la perturbation du trafic vésiculaire, de nouvelles expériences ont été réalisées. L'effet d'un traitement simultané des cellules avec de la bafilomycine A1 et un ionophore tel que la monensine qui est capable de restaurer le potentiel de membrane perturbé par la bafilomycine (Malecki et al, 2002) a été testé. Ce traitement permet de restaurer partiellement l'infectivité du DHBV qui était inhibée par la bafilomycine A1.

→ Le potentiel de membrane des endosomes joue un rôle dans l'infection par le DHBV.

En conclusion, l'entrée du DHBV nécessiterait donc l'endocytose des virus, leur adressage dans les endosomes précoces et leur transport à partir de ces derniers vers un compartiment toujours inconnu ne correspondant ni aux lysosomes, ni à l'appareil de golgi. De plus, le mécanisme permettant la libération des nucléocapsides dans le cytosol serait indépendant de l'acidification des endosomes mais nécessiterait le maintien du potentiel de membrane au sein de ces organites.

Par une autre approche, en suivant l'endocytose des particules virales par microscopie confocale, Chojnacki *et al* semblent avoir identifié le compartiment cellulaire au sein duquel la libération des nucléocapsides aurait lieu. Après leur fixation sur les hépatocytes à 4°C, les virus sont internalisés et peuvent être colocalisés dans les endosomes, précoce et tardifs probablement, avec de la transferrine marquée, ce qui est en accord avec les études de Kock *et al* et Funk *et al* (Funk et al, 2006; Funk et al, 2004; Kock et al, 1996a). L'infection peut être inhibée par la bafilomycine A1 lorsque celle-ci est ajoutée dès le début de l'infection, confirmant le rôle du

trafic endosomal lors de l'entrée virale. Le blocage de l'infection diminue progressivement lorsque la bafilomycine est ajoutée avec un temps de latence après la fixation des virus, et son effet disparaît complètement si elle est ajoutée 8h après la fixation des virus, suggérant que tous les virus ont été transportés, probablement dans les endosomes tardifs compte tenu de leur colocalisation avec de la transferrine marquée, au bout de 8 heures après le début de leur internalisation (Chojnacki et al, 2005). Cependant, les auteurs ne présentent aucune preuve directe du passage des virus dans les endosomes tardifs telle que la colocalisation des virions avec des marqueurs spécifiques de ces compartiments (par exemple LAMP1). Toutefois, en accord avec les études de Funk *et al*, ces résultats suggèrent que le trafic intracellulaire des particules virales est un processus long pouvant être bloqué par un inhibiteur du transport vésiculaire entre les endosomes précoces et les endosomes tardifs (Funk et al, 2006; Funk et al, 2004). De plus, puisque les agents lysosomotropiques tels que le NH₄Cl et la chloroquine ne bloquent pas l'infection par le DHBV (Kock et al, 1996a; Rigg & Schaller, 1992), alors qu'ils sont capables de neutraliser le pH dans les endosomes précoces (puisque'ils bloquent l'infection par le Semliki Forest virus), Chojnacki *et al* suggèrent que la libération des nucléocapsides de l'enveloppe virale du DHBV se ferait grâce à un mécanisme de fusion dans les endosomes tardifs dont le pH ne serait pas neutralisé par ces agents. En effet, des virus dont le peptide de fusion de la protéine L est muté restent bloqués dans les endosomes et peuvent être colocalisés avec la transferrine sans doute suite à un blocage du mécanisme de fusion (*cf.* chapitre « Les protéines de fusion des hepadnaviridae », page 76) (Chojnacki et al, 2005). Enfin, les résultats de cette étude démontrent que le mécanisme de fusion serait potentialisé par un pH acide mais pourrait également avoir lieu à un pH neutre. Le modèle proposé par ces auteurs qui est en accord avec la majorité des études concernant le trafic intracellulaire des particules virales est donc le suivant : (i) attachement des virus sur leur récepteur à la surface des hépatocytes, (ii) endocytose des particules virales, (iii) transport des virus des endosomes précoces vers les endosomes tardifs, (iv) changement de conformation de la protéine L, facilité par un pH acide, nécessaire à l'induction du mécanisme de fusion, (v) fusion entre l'enveloppe virale et la membrane des endosomes tardifs aboutissant à la libération des nucléocapsides dans le cytoplasme.

2. Cas du VHB

En comparaison avec le modèle du DHBV, le nombre de travaux publiés ayant visé à identifier la voie utilisée par le VHB pour entrer dans les hépatocytes est très limité. La principale étude sur ce sujet a été réalisée en 1997 par Hagelstein *et al*. D'après ce travail, l'entrée du VHB serait indépendante de l'acidification des endosomes puisque l'infection d'hépatocytes humains en culture primaire par le VHB n'est pas bloquée par un prétraitement

des virus à pH acide et qu'elle n'est pas affectée par la présence d'agents lysosomotropiques (Hagelstein et al, 1997).

B. Mécanisme

Après leur adsorption à la surface des cellules et leur internalisation, les virus doivent libérer leur nucléocapside dans le cytoplasme afin que le processus d'infection se poursuive. Deux mécanismes, la translocation ou la fusion, pourraient être impliqués dans cette étape du cycle viral :

1. Translocation

Une séquence peptidique présente dans le domaine Pre-S2 des protéines d'enveloppe des hepadnavirus, capable de traverser les membranes cellulaires grâce à un mécanisme indépendant de l'énergie, a été identifiée en 2000 par Oess et Hildt (Oess & Hildt, 2000). Cette séquence, nommée « translocation motif » (TLM) est localisée entre les acides aminés 41 et 52 du domaine Pre-S2 du VHB. La structure du TLM correspond à une hélice α amphipatique capable d'induire le transfert, à travers les membranes, de peptides, d'acides nucléiques, et de protéines qui y sont fusionnés, via un mécanisme indépendant de l'énergie et de la reconnaissance d'un récepteur (Hafner et al, 2003; Oess & Hildt, 2000; Saher & Hildt, 1999). Le mécanisme de translocation est encore mal connu. De nombreuses protéines capables de traverser les membranes et contenant un motif comparable au TLM ont été identifiées dans la littérature. Ces protéines contiennent un motif peptidique de type « cell penetrating peptide » (CPP) leur permettant de traverser les membranes. Deux grands types de CPPs peuvent être distingués d'un point de vue structural, les polycations riches en résidus arginines et les hélices amphipatiques [pour revue, consulter la référence (Heitz et al, 2009)]. Ces peptides sont particulièrement étudiés dans les domaines de la thérapie génique et de la vectorisation des médicaments du fait de leur propriété de transfert intracellulaire de molécules.

a. Cas du DHBV

La protéine L du DHBV contient deux motifs de translocations localisés entre les résidus 20 et 31 (TLM1) et 42 et 53 (TLM2) du domaine Pre-S (Stoeckl et al, 2006). Grâce à une étude de mutagenèse, consistant en la délétion simple ou simultanée des TLMs, Stoeckl *et al* ont démontré que les TLMs n'étaient pas indispensables au mécanisme d'assemblage viral. A l'inverse, la délétion de ces motifs inhibe complètement l'infection des hépatocytes primaires de canard par le DHBV. Des tests d'attachement des particules virales à la surface des hépatocytes primaires, ainsi que la quantification des virus internalisés 3 heures après leur fixation à la surface des cellules suggèrent que les TLMs jouent un rôle après l'endocytose des particules virales. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, il est probable que l'infection par le

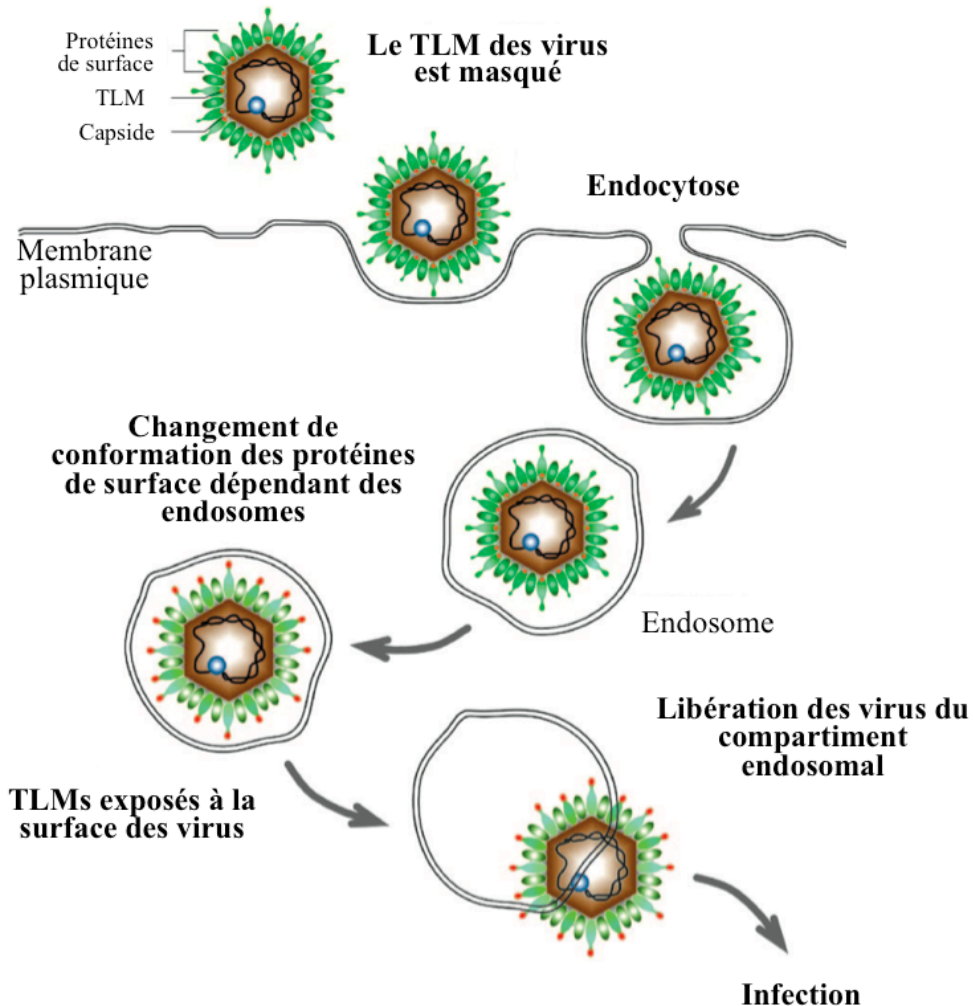


Figure 23. Modèle représentant le mécanisme de translocation par lequel les virus libéreraient leur nucléocapside dans le cytoplasme des cellules infectées. Après la reconnaissance d'un récepteur à la surface des cellules, les virus sont internalisés puis adressés aux endosomes. Le pH acide ainsi que les protéases de ces compartiments intracellulaires induisent un changement de conformation des protéines d'enveloppe qui permet l'exposition du motif de translocation du domaine Pre-S2 à la surface des particules. Les virus peuvent alors traverser la membrane des endosomes afin de se retrouver dans le compartiment cytoplasmique dont l'environnement réducteur permet la dissociation des ponts disulfures de l'enveloppe virale qui devient alors accessible aux protéases cytoplasmiques. Source : (Stoeckl et al, 2006).

DHBV nécessite l'endocytose des virus et leur transport vers les endosomes tardifs. En se basant sur ces données, Stoeckl *et al* ont réalisé des expériences afin de tester l'hypothèse selon laquelle les TLMs pourraient être impliqués dans la libération des virus des endosomes afin qu'ils atteignent le compartiment cytoplasmique. Ils ont observé que dix heures après l'infection, les virus dont les TLMs avaient été délétés s'accumulaient dans la fraction endosomale des cellules, et que contrairement aux virus sauvages, on ne les retrouvait pas dans la fraction cytoplasmique. Ces résultats leur ont permis de démontrer que la libération des virus internalisés, à partir des endosomes, nécessitait la fonctionnalité des TLMs. Des expériences d'immuno-précipitation avec des anticorps dirigés contre les TLMs ont ensuite permis de démontrer que les particules virales natives n'exposaient pas à leur surface les TLMs, empêchant ainsi leur translocation au niveau de la membrane plasmique. Leur exposition nécessite le passage des virus dans le compartiment endosomal dans lequel un ou plusieurs clivages protéolytiques sont nécessaires. L'ensemble de ces résultats a permis d'élaborer un nouveau modèle concernant le mécanisme d'entrée du DHBV, selon lequel les virus sont internalisés, adressés vers les endosomes dans lesquels un clivage protéolytique permettrait l'exposition à leur surface des TLMs, puis libérés dans le cytoplasme grâce à un mécanisme de translocation (Fig. 23). Une fois dans le cytoplasme, il est probable que l'environnement réducteur de ce compartiment permette la réduction des ponts disulfures de l'enveloppe et affecte les interactions nucléocapside – protéines de surface, libérant ainsi les capsides de l'enveloppe virale afin qu'elles soient adressées au noyau des cellules.

b. Cas du VHB

Après avoir démontré le rôle des TLMs de la protéine L du DHBV lors de l'infection, Stoeckl *et al* ont voulu confirmer leurs résultats dans le modèle du VHB. Pour cela, ils ont incubé des particules virales pendant 1 heure avec un lysat d'endosomes de cellules HepG2, puis ont utilisé ces particules pour infecter des cellules HuH7 normalement non susceptibles à l'infection. L'infection de près de 40 % des cellules HuH7 dans ces conditions suggère que l'exposition du TLM, présent dans le domaine Pre-S2 des protéines L et M du VHB, a permis la translocation des virus directement à la membrane plasmique et ainsi a permis l'infection des cellules (Stoeckl *et al*, 2006). L'obtention de résultats comparables avec le modèle du DHBV renforce l'hypothèse selon laquelle le TLM est nécessaire à l'infection. Cependant, ces résultats démontrent le rôle du TLM du domaine Pre-S2 du VHB de façon indirecte sans utiliser de virus dont le TLM est délété pour infecter des cellules susceptibles à l'infection telles que des hépatocytes primaires ou des cellules HeparG. De plus, Le Seyec *et al* ont démontré dans une étude réalisée en 1998 que la séquence abritant le TLM, dans la protéine L, n'était pas impliquée dans les étapes d'assemblage et d'infection (Le Seyec *et al*, 1998). Le TLM de la protéine M

n'ayant pas été délété dans cette étude, une partie de mon travail de thèse a consisté à vérifier le rôle du TLM du domaine Pre-S2 des protéines d'enveloppe du VHB lors de l'étape d'infection. Les résultats de ce travail constituent le premier chapitre de la partie « résultats » de ce manuscrit. En parallèle de notre étude, deux équipes ont voulu vérifier le rôle du TLM du VHB lors de l'infection. Ces études ont démontré en accord avec nos résultats que le TLM présent dans le domaine Pre-S2 des protéines L et M n'était pas nécessaire au processus d'infection par le VHB ou le VHD (Blanchet & Sureau, 2007; Gudima et al, 2007).

2. Fusion

Après l'adsorption des virus à la surface des cellules grâce à l'interaction de leurs protéines de surface avec un ou plusieurs récepteurs cellulaires, les virus enveloppés doivent classiquement libérer leur nucléocapside dans le cytoplasme des cellules cibles grâce à un mécanisme de fusion entre l'enveloppe virale et une membrane cellulaire [pour revue, consulter la référence (Harrison, 2008)]. Le processus de fusion membranaire suppose plusieurs étapes défavorables d'un point de vue énergétique. Il nécessite le rapprochement de l'enveloppe virale et de la membrane plasmique, défavorable du fait des forces de répulsions électrostatiques qui s'exercent entre les deux membranes, mais aussi du fait de la présence de molécules d'eau qui interfèrent dans le rapprochement des deux membranes lipidiques. De même, la fusion membranaire est elle-même énergétiquement coûteuse puisqu'elle nécessite la déstabilisation de la structure ordonnée des deux bicouches lipidiques. L'énergie nécessaire à la fusion est fournie par les glycoprotéines d'enveloppe, qui passent lors du processus de fusion, d'une conformation pré-fusionnelle métastable, à une conformation post-fusionnelle plus stable et donc énergétiquement plus favorable.

A ce jour, deux mécanismes permettant de déclencher ce changement de conformation aboutissant à la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cytoplasmique ont été décrits, selon les virus :

- Pénétration pH-indépendante : le changement de conformation est induit par l'interaction entre un récepteur membranaire et une protéine d'enveloppe ; la fusion a lieu directement au niveau de la membrane plasmique.
- Pénétration pH-dépendante : suite à l'étape d'attachement, une protéine de l'enveloppe interagit avec un récepteur cellulaire qui oriente le virus vers une voie d'endocytose. Au niveau de l'endosome, l'acidification du milieu entraîne la protonation de certains résidus de la glycoprotéine, qui la déstabilise et déclenche le changement de conformation à l'origine du processus de fusion.

Selon l'organisation et la conformation des protéines de surface et le mécanisme de fusion impliqué, trois grandes classes de protéines de fusion ont été identifiées. Les protéines

d'enveloppe du VHB ne semblent pas y avoir leur place compte tenu de leur structure présumée qui est très différente de celle des protéines de fusion connues.

a. Les protéines de fusion de classe I

L'hémagglutinine (HA) du virus de la grippe de type A (Orthomyxoviridae) constitue le prototype des protéines de fusion de classe I. Elle a été la première protéine de fusion pour laquelle des données structurales ont été disponibles. Dès 1981, la structure de son domaine extracellulaire a été cristallisée dans une conformation pré-fusionnelle (Wilson et al, 1981). Treize ans plus tard, la même protéine a été cristallisée dans sa conformation post-fusionnelle (Bullough et al, 1994). La comparaison de ces deux structures a permis d'identifier les changements de conformation induits par le mécanisme de fusion [pour revue, consulter la référence (Harrison, 2008)]. Depuis, l'étude de nombreuses protéines de fusion virales a permis de mettre en évidence des similitudes de structure et de mécanisme réactionnel entre les protéines de fusion des virus appartenant aux familles des Paramyxoviridae, des Filoviridae, des Retroviridae et des Coronaviridae. Les protéines de surface de ces virus, dites de classe I, partagent plusieurs propriétés (Kielian & Rey, 2006) telles que :

- La maturation des protéines de fusion implique le clivage d'un précurseur de haut poids moléculaire en deux sous-unités (ex : La protéine HA est clivée pour générer les sous-unités HA1 et HA2).
- l'hélice α est la structure secondaire majoritaire de ces protéines.
- le changement de conformation lors de la fusion provoque la transition entre un trimère métastable de protéines de fusion et un trimère plus stable des mêmes protéines.
- Le mécanisme de fusion fait intervenir une structure trimérique de type « coiled-coil » qui permet le repliement des protéines de fusion.
- Le peptide de fusion est localisé, dans la majorité des cas, à l'extrémité N-terminale d'une des sous-unités protéiques (ex : HA2).

Le mécanisme de fusion mis en place par les protéines de fusion de classe I peut être illustré par la description de celui de la protéine de fusion HA, bien que des variations existent selon les virus, notamment concernant le déclenchement de la fusion (pH dépendant ou indépendant). Les différentes étapes permettant d'aboutir au processus de fusion induit par la protéine HA sont les suivantes (Harrison, 2008):

1) Le précurseur des glycoprotéines de surface (HA0), sous forme de trimère, doit être clivé lors de la maturation des virions pour donner deux sous-unités, HA1 et HA2, jouant chacune un rôle distinct lors de l'entrée virale.

2) La sous-unité HA1, qui porte la fonction de reconnaissance du récepteur permet la fixation des virus à la surface des cellules et leur endocytose.

3) Le pH acide du compartiment endosomal provoque des changements de conformation irréversibles des sous-unités HA1 et HA2 à l'origine de la fusion membranaire entre la membrane endosomale et l'enveloppe virale. Avant le choc de pH, l'extrémité N-terminale de HA2, qui correspond au peptide de fusion, est cachée dans une poche hydrophobe. A pH acide, la protonation de certains résidus situés dans la niche hydrophobe, occupée par le peptide fusogène, déstabilise l'interaction entre le peptide de fusion et les résidus de la niche. De plus, la protonation d'une histidine fait apparaître une charge positive qui engendre un effet répulsif sur l'extrémité NH_4^+ chargée du peptide de fusion, induisant son expulsion de la poche.

4) Le peptide de fusion est alors projeté vers la membrane phospholipidique de la cellule cible, dans laquelle il s'ancre du fait de sa nature hydrophobe. La sous-unité HA2 relie ainsi l'enveloppe virale à la membrane de la cellule cible.

5) Dans un deuxième temps, la sous-unité HA2 se replie sur elle-même grâce à la formation d'une structure en "6-helix bundle" (coiled-coil constitué de 6 hélices). Les extrémités C-terminale et N-terminale de la protéine se rapprochent et prennent une orientation antiparallèle. Ce repliement conduit au rapprochement des membranes, ainsi que des domaines transmembranaires et des peptides de fusion, afin d'induire la fusion membranaire qui passe par de multiples intermédiaires lipidiques comme le stade d'hémifusion, avant d'aboutir à la formation d'un pore.

6) Bien que les données soient encore peu précises, il semble qu'un minimum de trois trimères d'HA soit nécessaire à la formation d'un pore fonctionnel. Le pore formé permet alors la libération des nucléocapsides dans le compartiment cytoplasmique afin que l'infection se poursuive.

b. Les protéines de fusion de classe II

Les virus appartenant aux familles des Togaviridae (ex : « semliki forest virus ») et Flaviviridae (ex : virus de l'hépatite C, virus de la dengue) contiennent des glycoprotéines d'enveloppe dotées d'une activité de fusion, dont la structure est très différente de celle des protéines de fusion de classe I. Elles ont été regroupées sous le nom de protéines de fusion de classe II. Toutes les protéines de fusion de classe II décrites à ce jour induisent la fusion membranaire par un mécanisme dépendant du pH. Comme pour les protéines de classe I, la fusion des bicouches phospholipidiques est l'aboutissement d'un processus au cours duquel des changements de conformation des protéines de fusion conduisent à la déstabilisation membranaire. Les principales caractéristiques des protéines de fusion de type II peuvent être résumées de la façon suivante (Kielian & Rey, 2006) :

- La maturation des protéines de fusion implique le clivage d'un partenaire protéique (protéine compagnon).

- le feuillet β est la structure secondaire majoritaire de ces protéines.
- le changement de conformation lors la fusion provoque la transition entre un dimère (homodimère ou hétérodimère selon les virus) métastable et un homotrimère plus stable de protéines de fusion.
- Le mécanisme de fusion fait intervenir un trimère de domaines en « épingle à cheveux » riches en feuillets β .
- Le peptide de fusion correspond à une boucle de fusion interne cachée dans la structure dimérique des protéines de fusion.

Globalement, le mécanisme de fusion engendré par les protéines de fusion de type II est le suivant [pour revue, consulter les références (Harrison, 2008; Kielian & Rey, 2006)] : (i) après la fixation des virus à la surface des cellules et leur endocytose, le pH acide des endosomes induit un réarrangement important des protéines de surface qui conduit à la dissociation des dimères et à l'exposition de la boucle de fusion; (ii) le pH acide et la présence de cholestérol dans la membrane cellulaire ciblée permet l'ancrage membranaire de la boucle de fusion ; (iii) les protéines de fusion alignées parallèlement les unes aux autres et reliant l'enveloppe virale à une membrane cellulaire forment alors un homotrimère ; (iv) les homotrimères se replient sur eux même afin de rapprocher l'enveloppe virale de la bicouche lipidique cellulaire. La coopération entre plusieurs trimères de protéines joue un rôle important lors de cette étape ; (v) le rapprochement progressif des domaines transmembranaires et des boucles de fusion aboutit progressivement à la fusion membranaire en passant par de multiples intermédiaires lipidiques comme le stade d'hémifusion, avant d'arriver à la formation d'un pore.

c. Les protéines de fusion de classe III :

Des données structurales récentes suggèrent l'existence d'une troisième classe de protéines de fusion dont les membres incluent les protéines de fusion des rhabdoviridae (VSV, virus de la stomatite vésiculeuse), herpesviridae (ex : HSV-1, virus herpes simplex de type 1) et baculoviridae [pour revue, consulter la référence (Backovic & Jardetzky, 2009)]. En 2006, les structures de l'ectodomaine (domaine exposé à la surface des virus) de la protéine de fusion G du VSV, et de la glycoprotéine gB du HSV-1 ont été déterminées, et ont révélé une homologie de structure non anticipée entre ces deux protéines compte tenu du fait qu'elles ne partagent pas d'homologie de séquence. Les structures secondaires et l'organisation des domaines de ces protéines sont très similaires. Alors qu'elles contiennent une structure trimérique centrale de type « coiled-coil », caractéristique des protéines de fusion de type I, elles contiennent également trois domaines principalement constitués de feuillets β et leur peptide de fusion est interne sous forme d'une boucle de fusion, ce qui est caractéristique des protéines de fusion de classe II. Du fait que ces protéines partagent des propriétés des protéines de fusion de classe I et II, il a été suggéré

que ces protéines définissaient une troisième catégorie, la classe III, de protéines fusogènes. Malgré les différences de structure avec les protéines des classes I et II, le mécanisme de fusion induit par les protéines de fusion de classe III est comparable à celui induit par les protéines des classes I et II. Globalement, pour chaque classe de protéine, la réorganisation des protéines de fusion fournit l'énergie nécessaire pour déclencher un mécanisme de fusion entre l'enveloppe virale et une membrane cellulaire grâce au rapprochement du domaine transmembranaire, ancré dans l'enveloppe, et de la boucle (ou peptide) de fusion enchâssée dans la membrane cellulaire.

d. Propriété des peptides de fusion

De nombreux critères peuvent être utilisés pour caractériser les peptides de fusion. Si aucun d'entre eux n'est absolu, leur combinaison permet de prédire l'existence d'un peptide de fusion dans une protéine. Leur caractéristique la plus marquée concerne le caractère hydrophobe de ces peptides, nécessaire à leur fonction d'interaction avec les bicouches lipidiques. En outre, ils contiennent généralement une quantité élevée de résidus glycine et alanine. Dans le cas des protéines de fusion virales, la présence de mutations dans leur séquence, capables d'inhiber le pouvoir infectieux des virions, est un argument quant à leur fonction lors de l'entrée virale. De plus, des peptides synthétiques dont la séquence correspond à celle d'un peptide de fusion ont une activité fusogène *in vitro*. Ils sont capables de déstabiliser les bicouches lipidiques et peuvent parfois induire le « mélange » des membranes de liposome (lipid mixing) ainsi que la formation de pores dans ces derniers conduisant à la libération de leur contenu (liposome leakage). Le tableau 5 résume les caractéristiques des peptides de fusion des protéines de classe I, II et III.

Protéine de fusion	Propriétés du peptide de fusion
Classe I	<ul style="list-style-type: none"> - Séquence conservée au sein de la même famille de virus - Localisation généralement en position N-terminale de la sous-unité transmembranaire (ex : HA2, gp41) - Riche en résidus glycine et alanine - Contient des résidus hydrophobes aromatiques tels que la phénylalanine - Contient un tripeptide conservé : « Phe -x-Gly » - Insertion dans la membrane cible sous forme d'une hélice amphipatique (Harrison, 2008; Kielian & Rey, 2006)
Classe II	<ul style="list-style-type: none"> - Séquence très conservée au sein de la même famille de virus - Localisation interne dans les protéines de fusion, sous forme d'une boucle de fusion - La boucle de fusion est localisée à l'extrémité d'une « tige » protéique composée de feuillettes β - Riche en résidus glycines - Riche en acides aminés hydrophobes aromatiques tels que le tryptophane et la

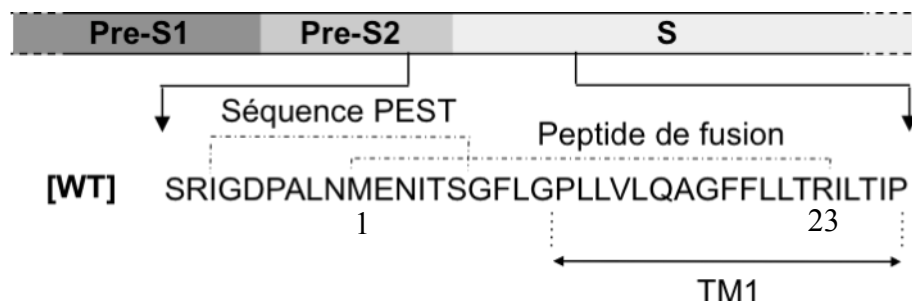


Figure 24. Séquence du peptide de fusion putatif des protéines d'enveloppe du VHB (AA 1-23 du domaine S) (Rodriguez-Crespo et al, 1994) et de la séquence PEST qui est une région susceptible de contenir des sites de clivage protéolytique impliqués dans l'exposition du peptide de fusion des protéines L et M (Lu et al, 1996).

	<p>phénylalanine</p> <ul style="list-style-type: none"> - Contient quelques résidus chargés positivement ou négativement (Asp, Glu, Arg et lys) - Présence de résidus cystéines impliqués dans la formation de ponts disulfures importants pour la structure de la boucle de fusion <p>(Harrison, 2008; Kielian & Rey, 2006; Lavillette et al, 2007)</p>
Classe III	<ul style="list-style-type: none"> - Séquence pas systématiquement conservée pour les virus de la même famille (ex : herpesviridae) - Localisation interne dans les protéines de fusion, en deux parties, correspondant donc à deux boucles de fusion. - Les boucles de fusion sont exposées à la surface des protéines de fusion - La composition en acides aminés est très variable selon les familles de virus. Des résidus tryptophane, tyrosine et alanine sont importants dans les peptides des protéines VSV G, HSV-1 gB, et EBV gB (herpesviridae et rhabdoviridae). Au contraire, des résidus leucine, phénylalanine, alanine, sérine et acide aspartique sont importants dans les boucles de fusion de la protéine gp64 des baculovirus. <p>(Backovic & Jardetzky, 2009)</p>

Tableau 5. Caractéristiques des peptides de fusion

e. Les protéines de fusion des hepadnaviridae

En 1994, une équipe espagnole a identifié, par homologie de séquence, un peptide de fusion putatif à l'extrémité N-terminale de la protéine S du VHB (Rodriguez-Crespo et al, 1994). Il est constitué des 23 premiers acides aminés de la protéine S et est interrompu par un résidu chargé, une arginine, en position 24 (Fig. 24). Sa taille comparable à celle des peptides de fusion d'autres protéines virales, l'absence de signal de glycosylation à sa proximité, son orientation avec une extrémité N-terminale prédite à l'extérieur des virus et une extrémité C-terminale transmembranaire ainsi que son hydrophobicité en font un candidat potentiel comme peptide de fusion. De plus, sa séquence est conservée parmi les hepadnaviridae. Elle est relativement riche en résidus glycines et contient un tripeptide Phe-x-Gly, retrouvé dans de nombreux peptides de fusion des protéines de classe I. Enfin, il semble que la distribution des acides aminés de ce peptide de fusion soit comparable à celle des acides aminés du peptide de fusion de la protéine GP41 du VIH, avec globalement les acides aminés volumineux et hydrophobes reposant sur une face de l'hélice, et les acides aminés plus petits et hydrophiles reposant sur l'autre face. Cette distribution des acides aminés est due à la présence d'un motif « heptad repeat » au niveau de ce peptide de fusion, qui consiste en la répétition tous les 4 et 3 acides aminés (4-3-4-3-4 etc.) de résidus hydrophobes. Ce motif confère un caractère amphipatique au peptide de fusion, avec une face de l'hélice plus hydrophobe que l'autre (Rodriguez-Crespo et al, 1994). Cette propriété peut être importante lors d'interactions entre des domaines protéiques en induisant la formation de

structure « coiled-coils », ou lors d'interactions entre une protéine et une bicouche lipidique (ex : peptide de fusion de la protéine HA2).

Ensuite, la même équipe a tenté d'analyser le rôle du peptide de fusion putatif des protéines d'enveloppe du VHB en synthétisant un peptide correspondant aux 16 premiers acides aminés de la protéine S. Ce peptide est capable d'interagir avec des phospholipides et cette interaction est favorisée à pH acide. Il permet le mélange de la membrane de liposomes (lipid mixing) à pH neutre, et de façon plus importante, à pH acide (Rodriguez-Crespo et al, 1995). Il est également capable de déstabiliser suffisamment la membrane de liposomes pour libérer leur contenu (liposome leakage). Enfin, ce peptide est capable d'induire une hémolyse (fuite d'hémoglobine), 10 fois plus importante à pH acide qu'à pH neutre, en déstabilisant la membrane de globules rouges. Ces résultats supportent le rôle de l'extrémité N-terminale de la protéine S du VHB lors d'un processus de fusion qui aurait lieu à pH acide après l'endocytose des virus. Cependant, le fait que l'activité des peptides soit potentialisée à pH acide ne reflète pas nécessairement le mécanisme de fusion ayant lieu lors du cycle viral. En effet, les peptides de fusion du VIH et du VIS (virus de l'immunodéficience des singes) qui induisent un mécanisme de fusion lors de l'infection, à pH neutre, au niveau de la membrane plasmique, ont une activité fusogène potentialisée *in vitro* à pH acide (Larsen et al, 1990; Larsen et al, 1993).

La caractérisation de la structure de ce peptide, par dichroïsme circulaire et par spectroscopie infrarouge avec transformé de Fourier, a permis de démontrer que la structure majoritaire de ce peptide dans un solvant organique favorable à la formation d'hélices α , le trifluoroéthanol, correspondait à une structure en hélice α malgré la présence de la proline en position 11 (Rodriguez-Crespo et al, 1996). Plus le pourcentage d'eau ajouté avec le solvant est augmenté, plus la structure des peptides change et s'oriente vers la formation de feuillets β formant des agrégats. Ces agrégats, obtenus avec des concentrations élevées de peptide, peuvent être dissociés grâce à des détergents anioniques, tels que le cholate de sodium, qui permettent de solubiliser les peptides en solution aqueuse tout en conservant leur structure en feuillets β . La capacité des peptides à former à la fois des hélices α et des feuillets β selon leur environnement reflète une certaine flexibilité conformationnelle de leur structure pouvant être importante pour leur activité fusogène (Hofmann et al, 2004). Les mêmes résultats sont obtenus à pH 5 et à pH 7. Afin de vérifier la conformation du peptide dans un environnement lipidique, la structure des peptides a été analysée en présence de phospholipides. Dans ces conditions, comme en présence de détergent, les peptides adoptent plutôt une structure en feuillets β pouvant correspondre à la structure active du peptide lorsqu'il interagit avec les bicouches lipidiques. Les peptides arborent cette conformation pour des ratios « phospholipides/peptide » faibles et élevés. Ces résultats divergent des données concernant la structure du peptide de fusion de la protéine HA2 du virus

influenza, dont la conformation en présence de phospholipides correspond à une structure en hélice α (Ishiguro et al, 1993; Lear & DeGrado, 1987). Cependant, ces résultats sont hautement dépendants des conditions expérimentales puisque selon le type de phospholipide et le ratio peptide/lipide utilisé, la structure des peptides est modifiée. Par exemple, le peptide de fusion des protéines de surface du VIH interagit avec des phospholipides sous forme d'hélice α à un ratio peptide/lipide faible, et sous forme de feuillets β à un ratio peptide/lipide plus élevé (Rafalski et al, 1990). La flexibilité de structure des peptides de fusion, potentiellement importante pour leur activité, complique donc l'interprétation de ces résultats et l'identification de la structure qu'ils adoptent au sein de la protéine de fusion lorsqu'ils sont envoyés dans la membrane de la cellule cible.

Des études comparables ont ensuite été menées sur des peptides de fusion synthétiques dérivés des protéines de surface du DHBV et du WHV (Rodriguez-Crespo et al, 1999). Ces peptides interagissent de façon pH indépendante avec les lipides et sont capables d'induire le mélange de la membrane de liposome ainsi que la fuite de leur contenu. Leur activité fusogène est supérieure à celle du peptide du VHB puisque pour un effet comparable lors d'un test mesurant la fuite du contenu de liposomes, il faut utiliser 70 μM de peptide dérivé du VHB contre 4 μM et 1 μM des peptides dérivés du WHV et du DHBV, respectivement. Quant à la structure de ces peptides, en présence de trifluoroéthanol, ils tendent à s'organiser plutôt sous la forme d'hélices α que sous la forme de feuillets β . En revanche, en présence de phospholipides, ils se comportent différemment. Alors que le peptide dérivé des protéines du DHBV adopte principalement une structure en feuillets β , celui dérivé des protéines d'enveloppe du WHV adopte majoritairement une structure en hélice α . En conclusion, comme pour le peptide dérivé des protéines de surface du VHB, ces peptides semblent dotés d'une plasticité structurale qui leur permet d'adopter différentes structures selon les conditions expérimentales.

Deux autres études soutiennent l'existence d'un peptide de fusion à l'extrémité N-terminale du domaine S des protéines d'enveloppe du VHB. La première, réalisée par Lu *et al* en 1996, suggère qu'un clivage protéolytique en amont du peptide de fusion dans les protéines L et M permettrait l'exposition du peptide dans ces protéines afin de déclencher un processus de fusion (Lu et al, 1996). Ces auteurs ont démontré que des particules virales dont les domaines Pre-S1 et Pre-S2 étaient éliminés grâce à un clivage protéolytique par la V8 protéase, qui coupe au niveau de l'acide glutamique en position 2 du domaine S, étaient capables d'infecter des cellules HepG2 normalement non susceptibles à l'infection, possiblement en induisant la fusion des virus à la membrane plasmique de ces cellules. Ces expériences suggèrent l'existence d'un mécanisme de fusion dépendant d'un clivage protéolytique et du pH acide, puisque les expériences d'infection ont été réalisées en incubant les cellules à pH 5,5. Le traitement des virus

avec de la chymotrypsine, qui clive les particules virales à la fin du peptide de fusion, génère quant à lui des particules virales non infectieuses. L'hypothèse proposée par les auteurs est la suivante : l'infection par le VHB nécessiterait la mise en place d'un processus de fusion à pH acide, dépendant du peptide de fusion présent à l'extrémité N-terminale du domaine S des protéines M et L. L'activation de ce peptide passerait par son exposition à la surface des particules virales grâce à un clivage protéolytique éliminant les domaines Pre-S. Le clivage aurait lieu au niveau d'une séquence riche en résidus proline, acide glutamique, serine et thréonine, dite séquence « PEST », localisée en amont du peptide de fusion dans la région où la V8 protéase possède son site de clivage (Fig. 24). Cependant, l'absence de reproductibilité de tels résultats par d'autres équipes, et notre incapacité à reproduire les expériences de clivage des virus par la V8 protéase (Philippe Gripon, travaux non publiés) soulèvent des doutes quant à la pertinence de ces résultats.

Enfin, une étude plus récente réalisée par Berting *et al* a mis en évidence la capacité d'une région du peptide de fusion putatif, localisée entre la glycine 7 et la leucine 15 (Fig. 24), à induire un processus d'hémifusion lorsqu'elle remplace une partie du peptide de fusion de la protéine HA2 du virus influenza (Berting et al, 2000). Ces résultats suggèrent que le peptide de fusion putatif des protéines d'enveloppe du VHB est capable d'initier un processus de fusion lorsqu'il est inséré dans la séquence d'une protéine de fusion.

Un aspect important permettant de déterminer le rôle du peptide de fusion au cours de l'entrée virale consiste à vérifier son implication lors de l'étape d'infection. Une étude réalisée avec le modèle du DHBV a permis de révéler l'importance du peptide de fusion putatif de la protéine L de ce virus lors de l'infection, dans une étape ultérieure à la reconnaissance du récepteur et à l'endocytose des virus (Chojnacki et al, 2005). Dans un premier temps, cette étude a démontré que l'infection d'hépatocytes primaires par le DHBV nécessitait le transport des virus des endosomes précoces vers les endosomes tardifs (*cf.* chapitre « Libération des nucléocapsides », page 63). Ensuite, les auteurs ont observé que la substitution d'acides aminés localisés sur la face la plus hydrophobe du domaine TM1, chevauchant le peptide de fusion putatif décrit par Rodriguez-Crespo *et al*, bloquait l'infection des hépatocytes primaires par le DHBV lorsqu'elles étaient introduites dans la protéine L. Au contraire, les mêmes mutations introduites dans la protéine S n'imbibent pas l'infectivité des virions suggérant que seul le peptide de fusion de la protéine L joue un rôle lors de l'étape d'infection. Toutefois, de façon surprenante, la même équipe avait démontré dans une étude antérieure, que les substitutions précédentes introduites dans la protéine S affectaient la translocation du domaine Pre-S de la protéine L (Grgacic, 2002). Aussi, il nous a paru surprenant que des mutations affectant l'exposition du domaine Pre-S à l'extérieur des virions n'inhibent pas le processus d'infection.

Quoi qu'il en soit, afin d'identifier le rôle du domaine TM1 de la protéine L lors de l'infection, des tests d'attachement à la carboxypeptidase D ont été réalisés. Ils ont permis de démontrer que ce domaine n'était pas impliqué dans la reconnaissance de ce récepteur. De plus, la colocalisation de virus mutants, dont le domaine TM1 est muté, avec de la transferrine marquée au niveau des endosomes suggère qu'il n'est pas nécessaire non plus à l'endocytose des virions (Chojnacki et al, 2005). Les auteurs ont donc émis l'hypothèse selon laquelle il serait impliqué dans un processus de fusion entre l'enveloppe virale et la membrane des endosomes. Cette dernière hypothèse est supportée par des tests de fusion *in vitro* ayant démontré que des peptides, dont les résidus importants pour l'infectivité des virions ont été mutés, ne déstabilisaient pas la membrane de liposomes contrairement au peptide sauvage correspondant. La mise en place d'un test de fusion entre des particules virales et des liposomes serait intéressante afin de comparer l'activité fusogène des virus sauvages et mutants. Contrairement au DHBV, le rôle du peptide de fusion chevauchant le domaine TM1 des protéines d'enveloppe du VHB n'a pas été évalué au cours de l'infection. Ce travail, présenté dans le chapitre des résultats, constitue la deuxième partie de mes travaux de recherche.

Récemment, Nuñez *et al* ont démontré que des domaines Pre-S recombinants non myristoylés (Pre-S1 + Pre-S2) étaient capables d'interagir avec des liposomes (Nunez et al, 2009). De plus, ces protéines recombinantes ont la propriété d'induire le mélange de la membrane de liposomes ainsi que la fuite de leur contenu indépendamment du pH. Ces résultats suggèrent que le domaine Pre-S des protéines d'enveloppe du VHB pourrait être impliqué dans un processus de fusion. Cependant, cette étude n'a pas permis d'identifier une courte séquence d'acides aminés responsable de cette propriété du domaine Pre-S.

III. Adressage nucléaire et décapsidation

Comme cela a été décrit dans le chapitre précédent, il semble que les hepadnaviridae entrent dans les cellules grâce à un transport vésiculaire mais que l'infection ne nécessite pas l'acidification d'un compartiment cellulaire. L'étape de translocation ou de fusion entre l'enveloppe virale et une membrane intracellulaire conduit ensuite à la libération des nucléocapsides dans le cytoplasme. Celles-ci sont alors acheminées jusqu'au noyau des cellules afin d'initier les premières étapes de la réplication du génome viral (Tuttleman et al, 1986). Après leur libération dans le cytoplasme, l'accumulation des nucléocapsides autour du noyau nécessite 15 minutes, suggérant leur prise en charge par un transport actif puisque la diffusion nécessiterait environ 1 heure (Rabe et al, 2006). L'existence d'un transport actif est supportée par le fait que l'accumulation des nucléocapsides au niveau de l'enveloppe nucléaire ainsi que la libération du génome viral puissent être inhibées par le nocodazole, qui est une drogue induisant

la dépolarisation des microtubules (Rabe et al, 2006). Le rôle de ces derniers a été confirmé dans deux études utilisant des systèmes expérimentaux différents consistant soit en l'utilisation de capsides dont la région N-terminale des protéines de capside a été fusionnée à un TLM afin qu'elles pénètrent dans des hépatocytes primaires humain, soit en l'injection de nucléocapsides dans le cytoplasme d'ovocytes de *Xenopus laevis* (Brandenburg et al, 2005; Pante & Kann, 2002). Par ailleurs, la deuxième approche a permis d'observer, grâce à la microscopie électronique, l'interaction entre les nucléocapsides et les complexes des pores nucléaires (CPN). Ces résultats sont en accord avec l'analyse de séquence de la protéine de capside qui a révélé la présence d'un NLS (nuclear localization signal) dans sa région C-terminale (Eckhardt et al, 1991; Yeh et al, 1990), ainsi que des sites de phosphorylation (Schlicht et al, 1989; Yeh & Ou, 1991; Yu & Summers, 1994). De façon non surprenante, du fait de la présence d'une séquence NLS, il a été démontré que l'attachement des nucléocapsides à l'enveloppe nucléaire était dépendant des importines α et β (Kann et al, 1999). Cependant, la séquence C-terminale de l'antigène HBc abritant le NLS n'est exposée ni à la surface de nucléocapsides contenant de l'ARN viral produites dans *E. Coli*, ni dans des nucléocapsides produites dans des cellules eucaryotes ne contenant pas la polymérase virale (Rabe et al, 2003; Zlotnick et al, 1997). En conséquence, ces capsides n'interagissent pas avec le noyau des cellules. Pour que le NLS soit exposé, la région C-terminale des protéines HBc doit être phosphorylée. Ainsi, des nucléocapsides contenant une molécule d'ARN viral, ayant été phosphorylées *in vitro* par la protéine kinase C, sont capables d'interagir avec les CPN (Kann et al, 1999). Cette liaison spécifique peut être inhibée par des anticorps dirigés contre les CPN ainsi que par des peptides de synthèse correspondant au NLS ou à la séquence C-terminale de l'antigène HBc.

Plus récemment, il a été démontré que l'exposition de la région C-terminale de la protéine de capside à la surface des particules était en fait liée à la maturation du génome viral, elle même corrélée à la phosphorylation de cette région (Rabe et al, 2003). En effet, des capsides dérivées de virus qui contiennent un génome mature sont capables de libérer leur ADN viral ainsi que les protéines de capsides désassemblées dans le nucléoplasme alors que des capsides qui ne contiennent pas de génome mature atteignent la cage (basket) des CPN, grâce à la présence de quelques NLS exposés à leur surface, mais ne libèrent pas leur génome immature dans le nucléoplasme. L'ensemble de ces résultats suggère l'existence de deux mécanismes de régulation de l'import nucléaire des nucléocapsides : (i) la maturation du génome viral, de l'ARN pré-génomique à l'ADN partiellement double brin, s'accompagne d'une phosphorylation progressive des protéines de capside qui exposent alors leur NLS afin d'être transportées vers les CPN, puis (ii) après la fixation des nucléocapsides sur les pores nucléaires via les importines, seules les capsides contenant un génome viral totalement mature libèrent leur contenu, alors que

les autres restent fixées dans la cage des CPN (Rabe et al, 2003). Une des hypothèses permettant d'expliquer ce deuxième point de contrôle suggère que les capsides matures exposent plus de NLS à leur surface que les immatures et que cela leur permet d'interagir avec plus de récepteurs de transport nucléaire (importines) afin de progresser dans le réseau hydrophobe des pores nucléaires et d'interagir avec des facteurs nécessaires à la libération de l'ADN viral. Il est possible d'imaginer que ce mécanisme permette d'augmenter l'efficacité d'infection par le VHB, en ne libérant dans le noyau des cellules infectées que des génomes matures et en permettant aux autres de compléter leur maturation au sein de la nucléocapside.

IV. Conversion de l'ADN relaxé circulaire en ADN superenroulé

Le génome du VHB présent dans les particules virales infectieuses correspond à une molécule d'ADN relaxée circulaire (ADNrc) partiellement bicaténaire. Les principales caractéristiques de l'ADNrc sont : (i) le brin d'ADN négatif est complet alors que le brin positif est incomplet, (ii) l'extrémité 5' du brin négatif est associée de façon covalente à la polymérase virale, et (iii) l'extrémité 5' du brin positif correspond à un oligonucléotide d'ARN, issu de l'ARN pré-génomique, qui sert d'amorce à la synthèse du brin positif. Cet ADNrc est libéré dans le noyau des cellules par les nucléocapsides et sert de matrice pour la fabrication d'une nouvelle forme d'ADN, appelée ADNccc, pour « covalently closed circle DNA » qui sert lui-même de matrice à la transcription des ARNs viraux par l'ARN polymérase II cellulaire (Miller & Robinson, 1984). La formation de l'ADNccc nécessite l'élimination des modifications précédentes, la synthèse d'un brin positif complet ainsi que la ligation covalente de chaque brin d'ADN. Cet ADNccc ou ADN superenroulé est synthétisé durant les premiers jours qui suivent l'infection (Gripon et al, 1993; Tuttleman et al, 1986). Le mécanisme permettant la conversion entre l'ADNrc et l'ADNccc est encore mal connu. Il semblerait cependant, d'après les résultats d'une étude réalisée avec le modèle du DHBV, que l'activité de la polymérase virale ne soit pas nécessaire à sa fabrication (Kock & Schlicht, 1993). Toutefois, des résultats plus récents utilisant des hépatocytes de Tupaia comme modèle d'infection (Kock et al, 2001; von Weizsacker et al, 2004), ont démontré que la formation d'ADNccc pouvait être fortement réduite par l'inhibition de l'activité reverse transcriptase de la polymérase virale (Kock et al, 2003). Finalement, ces résultats suggèrent donc un rôle de la polymérase virale, qui pourrait par exemple être impliquée dans le prolongement du brin d'ADN positif.

Des hépatocytes infectés par un hepadnavirus contiennent entre 5 et 50 copies d'ADNccc ou plus (Zhu et al, 2001), sous forme de minichromosomes associés à des protéines de type histone (Bock et al, 1994; Bock et al, 2001; Newbold et al, 1995). L'amplification du nombre de copies d'ADNccc au sein des cellules infectées par le DHBV a lieu grâce à la fabrication de

nouveaux génomes sous forme d'ADNrc, qui comme le génome ayant initialement permis l'infection, sont importés dans le noyau et transformés en ADNccc (Tuttleman et al, 1986; Wu et al, 1990). Le nombre élevé de copies d'ADNccc dans les cellules ainsi que sa durée de vie importante contribuent au maintien du génome viral dans les cellules infectées même en présence de traitements antiviraux (Ganem & Prince, 2004). De façon intéressante, il semble que l'amplification du nombre de copies d'ADNccc dans les cellules infectées par le DHBV s'arrête lorsque la quantité de protéines d'enveloppe produite est suffisamment importante. Ainsi, après leur encapsidation, les nouveaux génomes produits ne sont plus recyclés dans le noyau des cellules mais sont enveloppés par les protéines de surface afin de fabriquer de nouveaux virions qui seront sécrétés hors de la cellule (Summers et al, 1990).

Ce phénomène de recyclage des nucléocapsides n'a pas été retrouvé dans les hépatocytes humains infectés *in vitro* par le VHB. Après une infection, l'apparition progressive de l'ADNccc suit la disparition des formes relaxées circulaires issues des virus qui ont pénétré dans la cellule. Aucune amplification n'est détectée par la suite (Gripon et al, 1993). Ces résultats ont été confirmés récemment par l'étude de Hantz *et al* utilisant comme modèle d'infection les cellules de la lignée HepaRG (Hantz et al, 2009). Par ailleurs, il a également été observé que l'inhibition de synthèse de la protéine L dans des hépatocytes humains infectés n'influçait pas le taux d'ADNccc (Le Seyec *et al*, travaux non publiés).

V. Transcription virale

A. Structures et fonctions des transcrits viraux

Deux classes de transcrits viraux se distinguent par la comparaison de leur taille avec celle du génome viral. Ceux de taille supérieure appartiennent à la classe des transcrits génomiques et ceux de taille inférieure constituent la classe des transcrits subgénomiques. Tous les transcrits viraux sont de polarité (+), comportent une coiffe à leur extrémité 5' et possèdent une extrémité 3' identique puisque le VHB ne possède qu'un seul site de polyadénylation localisé dans la séquence codante du gène de la capsid. Les transcrits subgénomiques ne subissent pas d'épissage, contrairement aux transcrits génomiques. Les ARNs viraux issus d'un épissage ont été détectés au niveau du sérum ou du foie de patients infectés ou dans des cellules transfectées, mais leur rôle au cours du cycle viral ainsi que leur effet sur les aspects cliniques de l'infection demeure incertain (Chen et al, 1989; Lee et al, 2008; Rosmorduc et al, 1995; Su et al, 1989a; Su et al, 1989b; Suzuki et al, 1989; Wu et al, 1991).

- Les transcrits génomiques :

Deux catégories de transcrits génomiques (de taille égale à environ à 3.5 kb) se distinguent par leur extrémité 5' située de part et d'autre du codon initiateur (ATG) de la région

pre-C (Fig. 19) (Will et al, 1987; Yaginuma et al, 1987). Les transcrits initiés en amont de cet ATG codent pour l'antigène HBe. Les ARNs initiés en aval assurent une double fonction. En tant qu'ARNs messagers, ils codent pour la protéine structurale de la capsid et pour la polymérase virale. En tant qu'ARNs pré-génomiques, ils sont encapsidés puis servent de matrice pour la synthèse de l'ADN viral (Enders et al, 1987).

- Les transcrits subgénomiques :

Les transcrits subgénomiques fonctionnent exclusivement en tant qu'ARNs messagers pour la traduction des protéines de l'enveloppe et de la protéine X. Deux promoteurs contrôlent la transcription des ARNs codants pour les protéines de surface. Le promoteur Pre-S1 initie la transcription d'un ARN de 2,4 kb dont l'extrémité 5' se situe en amont des régions Pre-S. Il sert principalement à l'expression de la protéine L et de façon accessoire à l'expression des protéines M et S (Gallina et al, 1992; Sheu & Lo, 1992; Standring et al, 1986). Le promoteur S, quant à lui, dirige la transcription d'ARNs de 2,1 kb qui débutent, soit en amont, soit en aval du codon initiateur de la protéine M (Cattaneo et al, 1983; Standring et al, 1984). Les transcrits courts, issus de ce promoteur, ne codent que pour la protéine S alors que les transcrits longs assurent la traduction des protéines M et S.

B. Mécanisme et régulation de la transcription

Les ARNs viraux sont transcrits à partir du brin négatif de l'ADN superenroulé grâce à l'ARN polymérase II cellulaire. La circularité de l'ADNccc permet la synthèse des ARNs subgénomiques et des ARNs génomiques de taille supérieure au génome viral. Lors de la transcription des différents gènes viraux, le signal de polyadénylation doit être contrôlé. En effet, puisque le même signal de polyadénylation est présent aux deux extrémités redondantes des ARNs génomiques, la synthèse de ces ARNs nécessite que le complexe transcriptionnel ignore le signal au premier passage puis l'utilise au second passage. L'usage de ce site de polyadénylation est en fait conditionné par des séquences régulatrices absentes de l'extrémité 5' des ARNs génomiques car elles sont localisées juste en amont du site d'initiation de leur transcription (Rusnak & Ganem, 1990).

La transcription des gènes viraux est notamment régulée par quatre promoteurs, deux enhanceurs et un élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE) (Tur-Kaspa et al, 1986; Tur-Kaspa et al, 1988).

- Les promoteurs viraux :

Le promoteur S permet l'expression d'un transcrit de 2,1 kb dont la présence est favorisée dans des cellules hépatocytaires. Cette expression préférentielle résulte de l'influence de l'enhancer II (Lopez-Cabrera et al, 1991; Zhou & Yen, 1990). De façon intéressante, le

promoteur S est activé par une voie de signalisation intracellulaire induite par un stress au niveau du réticulum endoplasmique (RE) (Xu et al, 1997b). Ce serait par cette voie d'activation que la protéine L contrôlerait le ratio entre les différentes protéines de surface, en agissant sur la synthèse des protéines M et S. En effet, une surexpression de la protéine L conduit à la rétention des protéines de l'enveloppe virale dans la lumière du RE (Ou & Rutter, 1987; Persing et al, 1986; Xu et al, 1997a; Xu et al, 1997b). Le stress induit par l'accumulation de la protéine L activerait le promoteur S pour rétablir un ratio correct entre les protéines de surface, autorisant à nouveau leur sécrétion.

Le promoteur Pre-S1 est un promoteur faible qui permet l'expression d'un transcrite de 2,4 kb. Ce promoteur est très peu actif dans des cellules non hépatocytaires. Son hépato-spécificité résulte essentiellement de son interaction avec le facteur transcriptionnel HNF-1 (Hepatocyte Nuclear Factor-1) retrouvé principalement dans les hépatocytes différenciés (Chang et al, 1989; Courtois et al, 1988).

Le promoteur C qui contrôle la transcription des ARNs génomiques est comme le promoteur Pre-S1, spécifique des cellules hépatocytaires. Cette spécificité tissulaire dépend en partie de facteurs transcriptionnels principalement hépatiques tels que HNF-4.

Le promoteur X régule la transcription d'un transcrite de 0,9 Kb qui code pour l'antigène HBx (Zheng et al, 1994). Il contient des sites de fixation pour des facteurs de transcriptions ubiquitaires et hépato-spécifiques. Le suppresseur de tumeur p53 interagit avec ce promoteur et réprime son expression (Takada et al, 1996).

- Les enhanceurs viraux :

Deux enhanceurs ont été identifiés dans le génome viral, de par leur capacité à influencer positivement l'expression des gènes viraux indépendamment de leur position et de leur orientation.

L'enhancer I, localisé entre le gène S et le gène X (Guo et al, 1991; Shaul et al, 1985), stimule l'expression de tous les gènes viraux (Hu & Siddiqui, 1991).

L'enhancer II se situe dans la phase ouverte de lecture du gène X (Yee, 1989; Yuh & Ting, 1990). Il joue le rôle d'activateur hépato-spécifique du promoteur C et du promoteur S (Hu & Siddiqui, 1991).

- L'élément de régulation post-transcriptionnelle :

Tous les transcrits viraux contiennent un élément de régulation post-transcriptionnelle (HPRE pour HBV Post-transcriptional Regulatory Element) situé dans la région de l'enhancer I et du gène X (Donello et al, 1996). Cet élément favorise l'accumulation des transcrits du gène S dans le cytoplasme (Huang & Liang, 1993; Huang & Yen, 1994). Il n'intervient, ni sur le niveau de transcription, ni sur la stabilité des ARNs, mais il favorise le passage des transcrits non

épissés du noyau au cytoplasme. En plus de sa fonction d'export nucléaire, le HPRE contient un élément enhancer de l'épissage (Heise et al, 2006). Une étude récente a permis de déterminer, par résonance magnétique nucléaire, une partie de sa structure (Schwalbe et al, 2008).

VI. Traduction et maturation des protéines

A. Polymérase virale

Le cadre ouvert de lecture codant pour la protéine P, ou polymérase virale, couvre près de 80% du génome des hepadnavirus. Les particules virales ne contiennent qu'une seule protéine P par particule probablement du fait de sa liaison covalente avec le génome viral (Bartenschlager & Schaller, 1992). La polymérase possède 3 domaines fonctionnels impliqués dans la réplication et un domaine non essentiel :

- l'extrémité N-terminale ou TP (Terminal Protein) permet la liaison covalente de la protéine avec l'extrémité 5' du brin (-) d'ADN (Bartenschlager & Schaller, 1988; Lanford et al, 1997) ;
- le domaine SPACER n'est pas indispensable aux activités de la polymérase car l'introduction de substitutions, délétions et insertions dans cette région n'affecte en rien son fonctionnement (Radziwill et al, 1990) ;
- la région ADN polymérase / transcriptase inverse contient un motif peptidique (YMDD) important pour l'activité de transcription inverse (Argos, 1988) ;
- le domaine RNase H est responsable de la dégradation de l'ARN pré-génome lors de la synthèse du brin (-) de l'ADN viral (Radziwill et al, 1990).

B. Antigène de la capsid et antigène e

L'antigène HBc est la protéine structurale majeure de la capsid (*cf.* chapitre « Nucléocapsid », page 41). Elle possède une extrémité C-terminale basique permettant sa liaison à l'ADN viral (Gallina et al, 1989; Petit & Pillot, 1985). Les protéines HBc sont capables de s'organiser spontanément pour former une capsid, même en absence d'ARN pré-génome. L'association spontanée de ces protéines est un processus dépendant de la concentration en protéines de capsid (Seifer et al, 1993; Zhou et al, 1992).

L'initiation de la traduction en 5' de la séquence pre-C, située en amont du gène C et dans le même cadre de lecture (Fig. 19), aboutit à la synthèse d'une protéine pre-C. La présence de cette séquence supplémentaire en position N-terminale de la protéine HBc, correspondant à un peptide signal, dirige la protéine vers le RE afin qu'elle soit sécrétée hors de la cellule. Au cours de ce processus, la protéine perd son extrémité C-terminale basique (Jean-Jean et al, 1989; Standring et al, 1988; Wang et al, 1991). Finalement, c'est une protéine de 16 kDa, nommée antigène HBe, que l'on retrouve dans le sérum des malades. La fonction exacte de cette protéine

n'a pas été déterminée, mais elle semble non indispensable à la réplication virale *in vitro* (Tong et al, 1991).

C. Protéine X

La protéine X (HBx) a été découverte en 1985 grâce à l'identification d'anticorps dirigés contre des épitopes de cette protéine (Kay et al, 1985). Elle est suspectée de jouer un rôle important dans le développement des hépatocarcinomes associés au VHB (*cf.* chapitre « VHB et carcinome hépatocellulaire », page 18). La protéine X est un régulateur multifonctionnel qui module la transcription, la transduction du signal, le cycle cellulaire, les voies de dégradation des protéines, l'apoptose et la stabilité génétique en interagissant directement ou indirectement avec des facteurs cellulaires [pour revue, consulter la référence (Tang et al, 2006)]. Elle permet d'augmenter l'expression des gènes du VHB ainsi que la réplication virale en agissant comme un coactivateur transcriptionnel collaborant avec des facteurs de transcription cellulaire. Ainsi, son inactivation grâce à des méthodes utilisant des ARNs interférents diminue la transcription et la réplication du VHB. De fait, le développement d'antiviraux ciblant la protéine X pourrait en théorie permettre de limiter la réplication virale et de diminuer le développement d'hépatocarcinomes associés au VHB.

D. Protéines de l'enveloppe virale

L'enveloppe des particules virales contient 3 types de protéines de surface (*cf.* chapitre « L'enveloppe virale », page 33) codée à partir d'un même cadre ouvert de lecture possédant 3 codons d'initiation de la traduction. La protéine majoritaire (S) est constituée exclusivement de la région S, commune aux 3 protéines de surface, qui comprend 226 AA. Elle assure leur ancrage dans la bicouche lipidique de l'enveloppe virale ou dans la membrane du RE, là où elles sont synthétisées. La protéine moyenne (M) possède 55 AA N-terminaux supplémentaires, correspondant à la région Pre-S2. Enfin, la grande protéine (L) comporte en plus des régions S et Pre-S2, une région Pre-S1 de 108 AA à son extrémité N-terminale (génotype D).

VII. Encapsidation et synthèse de l'ADN viral

A. Encapsidation de l'ARN pré-génome

Avant d'être rétrotranscrit, l'ARN pré-génomique est enfermé avec la polymérase virale dans les nucléocapsides composées de protéine HBc. Son encapsidation fait intervenir une structure en épingle à cheveux présente à son extrémité 5', appelée signal d'encapsidation ou epsilon (ϵ). En plus de sa fonction première, le signal ϵ est impliqué dans l'activation de la polymérase virale et permet d'initier la synthèse d'ADN par transcription inverse [pour revue, consulter la référence (Beck & Nassal, 2007)]. Etant donné que les ARNs génomiques ont une

taille supérieure à celle du génome viral, leurs deux extrémités possèdent des séquences nucléiques communes. Or c'est dans cette région que se situe le signal ϵ . Les ARNs génomiques ont donc un signal ϵ à chacune de leurs extrémités. Cependant, on sait que seul le signal en 5' est fonctionnel. Cette observation explique pourquoi les ARNs subgénomiques, qui n'ont qu'une seule séquence ϵ en 3', ne sont pas encapsidés.

La première étape d'encapsidation consiste en la reconnaissance du signal ϵ par l'extrémité N-terminale de la polymérase virale (Bartenschlager & Schaller, 1992; Junker-Niepmann et al, 1990). Cette liaison ARN/protéine est indispensable à l'encapsidation du complexe. Ensuite, l'extrémité C-terminale libre de la polymérase interagirait directement ou indirectement avec des protéines HBc (Hirsch et al, 1990; Pollack & Ganem, 1994). Cette interaction entre les deux protéines virales (P et C) suffirait à initier l'encapsidation sachant que les protéines HBc s'assemblent spontanément sous forme de capsid.

Comme nous l'avons vu précédemment, il existe deux catégories d'ARNs génomiques, or seuls les plus courts sont encapsidés et servent de matrice à la synthèse d'ADN. La discrimination entre ces deux types de transcrits génomiques s'effectuerait simplement grâce à la présence de l'AUG du pre-C sur les ARNs les plus longs. En effet, une simple mutation qui détruit ce codon initiateur rend ces ARNs susceptibles à l'encapsidation (Nassal et al, 1990). Ainsi, Nassal et ses collaborateurs en ont conclu que la capacité du signal ϵ à être traduit était un élément décisif permettant de déterminer si un ARN contenant le signal ϵ devait être encapsidé ou non. On peut imaginer que le ribosome qui a débuté la traduction vient déstabiliser la structure secondaire du signal ϵ . Au niveau des ARNs pré-génomes, qui interagissent préférentiellement avec la polymérase issue de leur propre traduction (Nassal et al, 1990), l'initiation de la traduction en aval du signal ϵ ne déstabiliserait pas la structure secondaire.

B. Synthèse de l'ADN viral

Une fois le complexe protéine/ARN encapsidé, la polymérase virale assure la production de l'ADN viral [pour revue, consulter les références (Beck & Nassal, 2007; Nassal, 2008)]. Au début du processus, la polymérase, située au niveau du signal ϵ en 5' de l'ARN pré-génome, synthétise un oligonucléotide de quatre bases (Wang & Seeger, 1993). Le complexe oligonucléotide/polymérase est transféré au niveau de l'extrémité 3' de l'ARN qui comporte une séquence complémentaire aux quatre bases, appelée région DR1 (Direct Repeat). Ensuite, l'élongation du brin (-) de l'ADN par transcription inverse est initiée grâce à la lecture, de 3' en 5', de l'ARN pré-génomique. L'ARN est dégradé de façon simultanée à la synthèse de l'ADN par l'activité RNase H de la polymérase virale, à l'exception d'un petit fragment correspondant aux nucléotides de l'extrémité 5' de l'ARN pré-génome. Cette petite séquence d'ARN, qui contient la

région DR1, est transférée à l'extrémité 5' du brin (-) de l'ADN grâce à sa complémentarité avec une région appelée DR2. Elle sert alors d'amorce à la synthèse du brin (+) (Lien et al, 1986; Seeger et al, 1986) dont l'élongation nécessite rapidement une circularisation de l'ADN car la polymérase est déjà rendue à l'extrémité 5' du brin (-). La circularisation s'effectue par l'appariement de l'extrémité 3' du brin (+) nouvellement synthétisé avec l'extrémité 3' complémentaire du brin (-), grâce aux régions DR. La polymérase s'arrête avant la synthèse complète de ce deuxième brin, ceci aboutissant à la formation d'un ADN viral circulaire, relaxé, partiellement double brin que l'on retrouve dans les virions excrétés.

VIII. Assemblage et sécrétion des particules virales

A. Particules subvirales

Il a été montré que le gène S contenait toute l'information nécessaire à l'assemblage et à la sécrétion des particules subvirales. En effet, des cellules transfectées avec un vecteur d'expression de la protéine S produisent des particules subvirales morphologiquement identiques à celles retrouvées dans le sérum. Les protéines S sont d'abord synthétisées dans la membrane du RE puis se dimérisent permettant ainsi la formation de ponts disulfures au niveau de certains résidus cystéines. Toutefois, ces ponts disulfures ne sont pas indispensables à la formation des particules subvirales (Wounderlich & Bruss, 1996). Les protéines forment ensuite des particules subvirales dans la lumière du RE par invagination de la membrane (Huovila et al, 1992; Roingard & Sureau, 1998). Les particules sont alors excrétées hors de la cellule par exocytose. Une étude réalisée en 2007 par Patient *et al* a démontré, grâce à des analyses de microscopie électronique, que les particules subvirales formées à partir de protéine S s'auto-assemblaient dans la lumière du réticulum endoplasmique sous forme de longs filaments branchés, contrairement au modèle présumé selon lequel la protéine S permettrait de former directement de petites particules sphériques (Patient et al, 2007). Ces longs filaments sont ensuite organisés et associés les uns aux autres sous forme de structures ressemblant à des cristaux afin d'être transportés dans des vésicules dérivées du RE, vers le compartiment intermédiaire entre l'appareil de Golgi et le RE (ERGIC). A l'intérieur du compartiment ERGIC, ils sont libérés et relâchés, et leur forme ainsi que leur taille empêche alors leur progression dans la voie de sécrétion. Cette progression requiert leur conversion en petites particules sphériques qui a lieu spontanément lorsque l'on purifie ces filaments par chromatographie d'affinité (Patient et al, 2007). Ce mode de formation des particules subvirales composées de protéine S a également été rapporté par une autre étude (Liou et al, 2008). Concernant la grande protéine, la moyenne se comportant plutôt comme la protéine S (Huovila et al, 1992), des filaments sont également retrouvés dans les cellules l'exprimant, et leur accumulation peut engendrer l'apoptose des

l'exprimant, et leur accumulation peut engendrer l'apoptose des cellules suite à un stress du RE (Foo et al, 2002). Ces filaments, retrouvés dans la lumière du RE, sont plus petits que ceux formés par la protéine S et ne sont pas transportés dans des vésicules bourgeonnant du RE (Patient et al, 2007). Ils sont transportés moins efficacement jusqu'au ERGIC expliquant potentiellement la rétention intracellulaire des particules composées de protéine L. En effet, si la protéine L n'est pas nécessaire à l'assemblage des particules subvirales, sa présence a d'importantes répercussions sur ce mécanisme. Sa surexpression est capable d'inhiber de façon dose dépendante la libération des particules subvirales (Cheng et al, 1986; Kuroki et al, 1989; Ou & Rutter, 1987; Persing et al, 1986; Standring et al, 1986) et des virions (Bruss & Ganem, 1991a). Dans un modèle de souris transgéniques contenant les gènes codant pour les protéines de surface, l'expression excessive de la protéine L conduit à l'accumulation, dans la lumière du RE des hépatocytes, de particules subvirales filamenteuses riches en protéine L (Chisari et al, 1987). L'absence de tels filaments dans la lumière de l'appareil de Golgi suggère que leur progression à travers la voie de sécrétion serait gênée par leur taille anormalement longue, en accord avec les observations récentes de Patient *et al.* La région N-terminale du domaine Pre-S1 est nécessaire à la propriété de rétention de la protéine L. En effet, la délétion des 19 premiers AA de la région Pre-S1 (génotype D) suffit à favoriser la sécrétion de la protéine L (Kuroki et al, 1989), mais uniquement en présence de protéine S (Bruss et al, 1996a). L'acide myristique participe aussi à la rétention (Prange et al, 1991). De façon intéressante, lorsqu'un signal de translocation est ajouté à l'extrémité N-terminale de la région Pre-S1, les protéines L, alors dans la conformation ePre-S, sont sécrétées même en absence des protéines S et M (Bruss & Vieluf, 1995; Gallina et al, 1995; Prange et al, 1995). Par microscopie électronique, des particules subvirales ont été observées dans la lumière du compartiment pré-Golgien de cellules n'exprimant que la protéine L (Xu et al, 1997a). Ces données indiquent que la rétention de la protéine L résulterait d'une interaction avec une protéine présente dans la lumière du compartiment pré-Golgien. La calnexine, appartenant à la famille des protéines chaperon, est une protéine candidate qui co-immunoprécipite avec la protéine L (Xu et al, 1997a), ou avec la protéine M glycosylée dans sa région Pre-S2 (Werr & Prange, 1998).

De façon intéressante, une étude a récemment suggéré que la formation des particules subvirales et des virions pourrait emprunter des voies différentes. En effet, alors que la formation et la production des virions nécessiterait la fonctionnalité de protéines impliquées dans la formation des compartiments endosomaux tardifs de type « corps multi vésiculaires », dont la lumière est riche en petites vésicules, la production des particules subvirales utiliserait une voie différente (Watanabe et al, 2007). Jusqu'à ce jour, les virus identifiés utilisant des fonctions nécessaires à la formation des corps multi vésiculaires pour leur bourgeonnement, sont des virus

à ARN assemblés au niveau de la membrane plasmique tels que le VIH. Il est donc intéressant de découvrir qu'un virus bourgeonnant dans un compartiment intracellulaire tel que le VHB puisse également utiliser une telle fonction. A la vue de ces résultats, il apparaît donc que la formation des particules subvirales et des virions implique un mécanisme différent et qu'il faille donc prendre des précautions dans l'extrapolation aux virus complets, des résultats issus de l'étude des particules subvirales. Par exemple, on peut imaginer que la composition lipidique des virions, déduite de celle des particules virales soit erronée. Cette hypothèse est cohérente avec les données structurales récentes sur les particules subvirales (Gilbert et al, 2005) et les virions (Dryden et al, 2006; Seitz et al, 2007), ayant mis en évidence une organisation différente des lipides entre ces particules.

B. Particules virales complètes

Des études par microscopie électronique ont montré que l'assemblage des virus s'effectuait au niveau des membranes intracellulaires, et non pas au niveau de la membrane plasmique (Kamimura et al, 1981; Roingeard et al, 1990). Les nucléocapsides doivent interagir avec les protéines de surface insérées dans la membrane du RE. Le mécanisme exact de cette étape d'assemblage des virions n'a pas encore été complètement élucidé, mais il a été démontré que les protéines S et L y était indispensables, contrairement à la protéine M (Bruss & Ganem, 1991b; Fernholz et al, 1993; Ueda et al, 1991). La topologie de la protéine L joue un rôle important dans la formation des particules de Dane. En effet, une protéine L fusionnée à un signal de sécrétion dans sa région N-terminale, n'existant que dans la conformation ePre-S, peut être sécrétée sous forme de particules subvirales (Prange et al, 1995), mais ne permet pas la formation de virions (Bruss & Vieluf, 1995). Ces résultats illustrent le rôle de la conformation iPre-S, dans laquelle la protéine L expose son domaine Pre-S du côté cytoplasmique, lors de l'enveloppement des nucléocapsides. En accord avec ces données, une région d'interaction avec les nucléocapsides, nécessaire à l'assemblage des virions, a été identifiée entre les acides aminés 92 et 113 du domaine Pre-S (génotype D) de la protéine L (Blanchet & Sureau, 2007; Bruss, 1997; Le Seyec et al, 1999). La substitution de deux résidus consécutifs dans cette région par des alanines inhibe l'enveloppement des nucléocapsides. De plus, cette interaction du domaine Pre-S avec la nucléocapside est supportée par des expériences *in vitro* ayant démontré la capacité de peptides dérivés du domaine Pre-S à se fixer sur des capsides recombinantes ou dérivées du foie d'individus infectés (Poisson et al, 1997). Une autre région des protéines d'enveloppe, localisée entre les deux premiers domaines transmembranaires et exposée du côté cytoplasmique de la membrane du RE, pourrait être importante pour l'interaction avec les nucléocapsides. En effet de petites délétions dans la région C-terminale de cette boucle cytoplasmique (CYL I) inhibent la

formation des virions mais pas des particules subvirales (Loffler-Mary et al, 2000). Toutefois, des mutations ponctuelles introduites dans cette région ne sont pas suffisantes pour bloquer l'assemblage des virions (Bruss, 2007). De plus, une étude récente réalisée par Blanchet et Sureau a présenté des résultats contradictoires à ceux de Loffler-Mary *et al* puisque ces auteurs n'ont pu identifier de mutations dans la première boucle cytoplasmique des protéines d'enveloppe autorisant la sécrétion des particules subvirales mais inhibant l'assemblage des virions (Blanchet & Sureau, 2006). Des sites de liaisons sur les protéines de capsid pour les protéines d'enveloppe ont également été identifiés par des analyses de mutagenèse. Ainsi, onze mutations ponctuelles localisées à la base des excroissances formées par les dimères d'AgHBc (*cf.* chapitre « Nucléocapsides », page 41) inhibent l'enveloppement des nucléocapsides (Ponsel & Bruss, 2003). De façon surprenante, des mutations à l'extrémité des pics des capsides n'ont pas d'effet sur leur enveloppement. Cependant, des peptides interagissant avec l'extrémité de ces pics bloquent la formation de virions (Bottcher et al, 1998; Dyson & Murray, 1995), en accord avec les observations structurales de Seitz *et al* suggérant un rôle important des acides aminés chargés à l'extrémité des pics pour l'interaction avec les protéines d'enveloppe (Seitz et al, 2007).

Contrairement à de nombreux virus enveloppés, on ne retrouve pas de protéines de l'hôte dans l'enveloppe des particules virales du VHB, et même les protéines de surface du DHBV ne s'y incorporent pas. Par contre, la protéine L du WHV est capable de substituer, bien qu'avec une faible efficacité, la protéine L du VHB pour l'assemblage des virions (Gerhardt & Bruss, 1995). Ces résultats illustrent l'importance des interactions spécifiques entre les protéines virales pour la sécrétion des particules subvirales et des virions.

Par ailleurs, tous les virions contiennent un génome viral constitué d'ADN circulaire partiellement double brin. Il a été démontré que seules les nucléocapsides dont la polymérase a synthétisé au moins le premier brin d'ADN du génome viral, pouvaient être enveloppées. En accord avec ces observations, une mutation qui inhibe l'activité de transcription inverse de la polymérase virale empêche l'enveloppement des nucléocapsides (Gerelsaikhan et al, 1996; Wei et al, 1996). Le mécanisme permettant d'expliquer cette observation est encore mal connu. Pour le DHBV, il a été démontré que comme les capsides de virions, des capsides matures dont la protéine HBc n'est pas hyperphosphorylée, s'attachaient aux membranes intracellulaires indépendamment des protéines d'enveloppe (Mabit & Schaller, 2000). A l'inverse, les capsides immatures sont hyperphosphorylées et n'interagissent pas avec les membranes. Ces observations suggèrent que la discrimination entre les capsides matures et immatures ne ferait pas intervenir les protéines d'enveloppe mais aurait lieu lors du transport des capsides vers les sites d'assemblage.

OBJECTIFS DE LA THESE

Le mécanisme d'entrée du virus de l'hépatite B dans sa cellule hôte, l'hépatocyte, est toujours inconnu. En effet, malgré les nombreuses études entreprises, le récepteur du virus, la voie d'internalisation qu'il emprunte ainsi que le mécanisme permettant la libération des nucléocapsides dans le cytoplasme des cellules infectées n'ont pas été identifiés. Ceci peut en partie s'expliquer par le manque de modèle d'infection *in vitro* jusque la fin des années 1980. En effet, le premier modèle d'infection, consistant en des hépatocytes humains cultivés en culture primaire, fut découvert en 1988 au sein de notre laboratoire par Philippe Gripon *et al* (Gripon et al, 1988). Cependant, bien que ce modèle permette d'obtenir une infection efficace et reproductible depuis 1993 (Gripon et al, 1993), la disponibilité des hépatocytes primaires ainsi que la qualité variable des préparations en font un modèle délicat à utiliser. Ce n'est finalement qu'à partir de 2002 que les découvertes se sont accélérées, grâce à la découverte de la première lignée infectable par le VHB, la lignée HepaRG (Gripon et al, 2002). Ces deux modèles d'infection ont notamment permis de découvrir l'importance du domaine Pre-S1 de la protéine L lors de l'étape d'infection (Blanchet & Sureau, 2007; Le Seyec et al, 1999) et sa probable implication dans la reconnaissance du récepteur viral (Barrera et al, 2005; Glebe et al, 2005; Gripon et al, 2005), ainsi que la présence d'un déterminant de l'infectivité dans la boucle antigénique du domaine S des protéines d'enveloppe (Abou-Jaoude & Sureau, 2007; Jaoude & Sureau, 2005; Salisse & Sureau, 2009).

La recherche de régions des protéines d'enveloppe nécessaires au processus d'infection constitue une stratégie pour mieux comprendre le mécanisme d'entrée virale. Une telle approche a permis de déterminer le rôle crucial du domaine Pre-S1 lors du processus d'infection (Le Seyec et al, 1999) et a mené au développement de peptides dérivés de ce domaine capables de bloquer l'infection par le VHB *in vitro* (Gripon et al, 2005) et *in vivo* (Petersen et al, 2008). Ainsi, cette stratégie a permis la découverte d'une nouvelle molécule antivirale capable de bloquer très efficacement le mécanisme d'entrée du VHB. A la vue du succès de cette approche, notre objectif a été d'utiliser les modèles d'infection précédents, pour étudier les premières étapes de l'infection, en tentant d'identifier de nouvelles régions des protéines de l'enveloppe virale impliquées dans ce processus. Pour cela, une méthodologie basée sur l'introduction de mutations ponctuelles ou de délétions au sein des gènes viraux codant pour les protéines virales de surface a été choisie. L'impact de ces modifications a été analysé sur les étapes d'expression des protéines mutées, de production de virus, puis sur le pouvoir infectieux des virions sécrétés.

Le mécanisme permettant la libération des nucléocapsides dans le cytoplasme des cellules infectées n'a toujours pas été élucidé. En ce qui concerne le DHBV, deux hypothèses qui

coexistent toujours ont été proposées. La première suggère que les particules virales entières traverseraient la membrane des endosomes grâce à un mécanisme de translocation et que la dégradation de l'enveloppe virale dans le cytoplasme permettrait alors la libération des nucléocapsides (Stoeckl et al, 2006). La seconde suggère qu'un mécanisme de fusion entre l'enveloppe virale et la membrane des endosomes tardifs permettrait cette libération (Chojnacki et al, 2005). Concernant le VHB, aucune expérience d'infection avec des virus mutants n'a été réalisée pour valider ou invalider ces hypothèses. Ainsi, le rôle lors de l'infection du motif de translocation (TLM) présent dans le domaine Pre-S2 des protéines d'enveloppe ainsi que du peptide de fusion localisé à l'extrémité N-terminale du domaine S n'a pas été déterminé. Nous nous sommes donc attachés à analyser le rôle de ces deux motifs au cours du processus d'entrée virale.

Dans un premier temps, nous avons étudié le rôle du motif de translocation (TLM) présent dans le domaine Pre-S2 des protéines de surface du VHB. Il a été démontré, grâce à une approche visant à introduire des délétions consécutives dans le domaine Pre-S2, que ce domaine n'était pas indispensable dans la protéine L au cours du processus d'infection (Le Seyec et al, 1998). Par ailleurs, la protéine M n'étant pas indispensable au processus d'infection (Fernholz et al, 1993), la présence de ce motif dans la protéine M est également facultative lors du processus d'infection. Toutefois, on ne peut exclure qu'un mécanisme de complémentation permette de muter le TLM soit dans la protéine L, soit dans la protéine M sans affecter le processus d'infection. Nous avons donc décidé d'analyser le pouvoir infectieux de virus dont le TLM était muté dans ces deux protéines (Article I).

Dans un second temps, nous avons analysé le rôle du peptide de fusion putatif des protéines de surface du VHB, localisé à l'extrémité N-terminale du domaine S, lors du processus d'infection. Ce peptide de fusion, capable d'induire la fusion de liposomes *in vitro* (Rodriguez-Crespo et al, 1995), est indispensable au processus d'infection dans le modèle du DHBV (Chojnacki et al, 2005). En effet, la substitution d'acides aminés hydrophobes dans sa séquence par des résidus alanine inhibe le processus d'infection. Compte tenu de ces résultats, nous avons décidé d'évaluer le rôle du peptide de fusion putatif du VHB lors de l'infection grâce à l'introduction de délétions consécutives dans sa séquence. Par ailleurs, nous avons décidé d'introduire ces délétions soit dans la protéine S, soit dans les protéines L et M afin d'étudier leurs rôles séparément. Nous avons analysé l'effet des mutations sur l'expression des protéines, l'assemblage des virions et sur le pouvoir infectieux des virus mutants (Article II).

RESULTATS

PARTIE I : ANALYSE DU ROLE DU MOTIF DE TRANSLOCATION PRESENT DANS LE DOMAINE PRE-S2 DES PROTEINES D'ENVELOPPE DU VHB LORS DE L'ETAPE D'INFECTION

I. Introduction

Pour infecter sa cellule cible, le VHB doit interagir avec un récepteur à la surface des hépatocytes, puis libérer sa nucléocapside dans le compartiment cytoplasmique. En 1994, Rodriguez-Crespo *et al* ont identifié un peptide de fusion putatif à l'extrémité N-terminale de la protéine S du VHB qui pourrait permettre ce processus grâce à un mécanisme de fusion entre l'enveloppe virale et une membrane cellulaire (Rodriguez-Crespo *et al*, 1994). Alors qu'aucune expérience ne prouve son rôle au cours de l'infection par le VHB, il semble que ce peptide de fusion soit nécessaire au maintien de l'infectivité des virions du DHBV (Chojnacki *et al*, 2005). En 2006, Stoeckl *et al* ont proposé une hypothèse alternative à la fusion impliquant un motif de translocation (TLM) localisé à l'extrémité C-terminale du domaine Pre-S2 des protéines d'enveloppe (Stoeckl *et al*, 2006). Le TLM est un domaine de 12 acides aminés capable d'induire le transfert, à travers des membranes, de protéines qui y sont fusionnées. Ce transfert est indépendant de l'énergie et de la reconnaissance d'un récepteur (Oess & Hildt, 2000; Stoeckl *et al*, 2006). D'après cette hypothèse, après l'adsorption des virus à la surface des hépatocytes et leur internalisation dans les endosomes, le TLM serait exposé à la surface des virus grâce à un changement de conformation des protéines d'enveloppe afin que ces derniers traversent la membrane des endosomes et se retrouvent dans le cytoplasme. Le rôle du TLM dans l'étape d'entrée du VHB a été suggéré par des expériences ayant démontré que l'exposition artificielle du TLM à la surface des virions pouvait induire l'infection de cellules de la lignée HuH7 normalement réfractaires à l'infection (Stoeckl *et al*, 2006). Cependant aucune expérience n'a été réalisée afin d'étudier la capacité de virus, dont le TLM est non fonctionnel, à infecter des hépatocytes humains. De plus, dès 1998, une étude réalisée par notre équipe avait démontré que le TLM de la protéine L du VHB n'était pas nécessaire à l'infectivité des virions (Le Seyec *et al*, 1998). Toutefois, dans cette étude, le TLM était toujours présent dans la protéine M, qui bien que non nécessaire au processus d'infection, pouvait fournir en *trans* un TLM fonctionnel responsable de l'infectivité des virus ayant perdu leur TLM uniquement dans la protéine L. Afin de compléter ces résultats, nous avons décidé d'analyser le pouvoir infectieux de virus dont le TLM des protéines L et M a été détruit.

II. Stratégie expérimentale

Afin d'étudier le rôle du TLM lors du processus d'infection, nous avons introduit dans le domaine Pre-S2 des protéines L et M, des mutations correspondant à des délétions consécutives de 10 acides aminés entre les résidus 114 et 163 (numérotation dans la protéine L) (Le Seyec et al, 1998). Ces délétions couvrent la totalité du domaine Pre-S2 à l'exception de ses cinq premiers acides aminés qui sont nécessaires au processus d'assemblage viral. Pour produire des virus sauvages ou mutés, des cellules de la lignée d'hépatome HepG2 ont été cotransfectées avec (i) un génome viral du VHB déficient pour la production de protéines d'enveloppe, (ii) un plasmide codant pour la protéine S et (iii) un plasmide codant pour les protéines L et M mutées ou sauvages. Les virus produits sont sécrétés et récoltés dans le surnageant de culture des cellules transfectées. Ils sont ensuite concentrés 50 fois dans des inocula dont le titre est déterminé par PCR quantitative. Globalement, les virus de chaque inoculum sont capturés au fond de plaques multi-puits grâce à un anticorps monoclonal reconnaissant le domaine Pre-S1, puis leur ADN est purifié et quantifié grâce à des amorces de PCR permettant l'amplification d'une région du gène de capsid. Pour analyser le pouvoir infectieux des virus mutants, des hépatocytes primaires ont été infectés avec les différents inocula et le niveau d'infection a été déterminé grâce à la quantification d'une part des ARNm viraux intracellulaires et d'autre part de l'AgHBe sécrété dans le surnageant de culture des cellules infectées, 10 jours après l'infection. Afin de prendre en compte les variations du nombre de particules virales entre les différents inocula, les résultats d'infection sont rapportés à la quantité de virus utilisée pour chaque infection.

III. Résultats et discussion

Ce travail a permis de confirmer que le domaine Pre-S2 des protéines L et M, à l'exception de ses cinq premiers acides aminés, n'était pas nécessaire au processus d'assemblage viral. L'analyse du pouvoir infectieux des virus mutants a ensuite permis d'identifier une région dans le domaine Pre-S2, entre les résidus 114 et 133 (numérotation dans la protéine L), agissant comme un fort modulateur de l'infection. En effet, alors que la délétion des dix premiers acides aminés de cette région augmente légèrement l'assemblage viral et diminue fortement l'infectivité des virus, la délétion des dix résidus suivant diminue légèrement l'assemblage et augmente l'infectivité d'un facteur 3 environ. La caractérisation plus précise du rôle de cette région lors du processus d'infection nécessiterait l'analyse de nouvelles mutations telles que des substitutions uniques ou combinées. Finalement, concernant les trois dernières délétions, dont deux détruisent le TLM, nous avons clairement démontré que les virus porteurs de ces mutations étaient capables d'infecter des hépatocytes humains en culture primaire avec la même efficacité que les virus sauvages. Ces données démontrent que le TLM présent dans le domaine Pre-S2 des protéines

d'enveloppe du VHB n'est impliqué ni dans le processus d'assemblage viral ni dans le processus d'infection. De plus, cette conclusion est supportée par deux autres études ayant démontré que le TLM du domaine Pre-S2 n'était pas nécessaire à l'infectivité du VHD (Gudima et al, 2007) et du VHB (Blanchet & Sureau, 2007). Ainsi, alors que ce motif semble nécessaire à l'infectivité du DHBV (Stoeckl et al, 2006), il n'est pas important pour l'infection du VHB. Toutefois, nos données ne peuvent exclure la possibilité qu'un autre TLM fonctionnel dans les protéines de surface du VHB, non identifié, puisse permettre la translocation des virus sauvages et mutés. Néanmoins l'implication d'un peptide de fusion lors de l'entrée virale, en accord avec des données obtenues avec le modèle du DHBV (Chojnacki et al, 2005), semble probable et a été analysée dans la deuxième partie des résultats (Article II).

IV. Article I

Lepère C, Régeard M, Le Seyec J, Gripon P

The translocation motif of hepatitis B virus envelope proteins is dispensable for infectivity
J Virol. 2007 Jul ; 81(14):7816-8. *PubMed PMID: 17494068*

PARTIE II : ANALYSE DU ROLE DU PEPTIDE DE FUSION PUTATIF DES PROTEINES D'ENVELOPPE DU VHB LORS DE L'ETAPE D'INFECTION

I. Introduction

Dans la première partie des résultats, nous avons vu que le mécanisme permettant la libération des nucléocapsides dans le cytoplasme des cellules infectées par le VHB, ne correspondait pas à un processus de translocation dépendant du TLM localisé dans le domaine Pre-S2 des protéines de surface. L'existence d'un mécanisme de fusion entre l'enveloppe virale et une membrane cellulaire constitue une hypothèse alternative à la translocation. En effet, un peptide de fusion putatif a été identifié à l'extrémité N-terminale du domaine S des protéines d'enveloppe grâce à son homologie de séquence avec d'autres peptides de fusion viraux (Rodriguez-Crespo et al, 1994). Cette séquence, soit N-terminale dans la protéine S ou interne dans les protéines L et M, est conservée parmi les hepadnaviridae et possède des caractéristiques structurales et fonctionnelles communes avec d'autres peptides de fusion (Rodriguez-Crespo et al, 1995; Rodriguez-Crespo et al, 1999). Dans les protéines L et M, une séquence PEST contenant probablement plusieurs sites de clivage protéolytique a été identifiée en amont de ce peptide de fusion (Lu et al, 1996). Un clivage dans cette séquence pourrait permettre l'activation du peptide de fusion. Dans cette étude, nous avons décidé d'analyser le rôle du peptide de fusion putatif et de la séquence PEST du VHB lors de l'étape d'infection.

II. Stratégie expérimentale

Afin d'étudier le rôle du peptide de fusion et de la séquence PEST lors de l'entrée virale, nous avons construit une série de virus mutants dont les protéines d'enveloppe comportent des délétions contiguës dans ces régions, puis nous avons analysé le pouvoir infectieux des virus *in vitro* en infectant des cellules de la lignée HepaRG. L'introduction de mutations soit dans les protéines L et M, ou dans la protéine S seule nous a permis d'étudier le rôle de ces protéines séparément. Pour étudier le rôle du peptide de fusion localisé à l'extrémité N-terminale du domaine S et dont la séquence chevauche partiellement le domaine TM1, nous avons choisi de déléter des groupes d'acides aminés en fonction de leur hydrophobicité. Ainsi, nous avons découpé la région d'intérêt en clusters d'une part d'acides aminés hydrophobes et d'autre part de résidus neutres ou polaires. Pour chaque mutant, nous avons analysé le niveau d'expression intra- et extracellulaire des protéines d'enveloppe mutées, la sécrétion d'antigènes HBs, la production de virus et l'infectivité.

Pour produire des virus sauvages ou mutés, des cellules de la lignée d'hépatome HepG2 ont été cotransfectées avec (i) un génome viral du VHB déficient pour la production de protéines d'enveloppe, (ii) un plasmide codant pour la protéine S sauvage ou mutée et (iii) un plasmide

codant pour les protéines L et M sauvages ou mutées. Les virus produits ont été récoltés dans le surnageant de culture des cellules transfectées et concentrés 50 fois dans des inocula dont le titre a été déterminé par PCR quantitative suite à la purification des particules virales grâce à des anticorps dirigés contre le domaine Pre-S1. Pour analyser le pouvoir infectieux des virus mutants, des cellules différenciées de la lignée HepaRG ont été infectées avec les différents inocula et le niveau d'infection a été déterminé grâce à la quantification de l'AgHBe sécrété dans le surnageant de culture des cellules infectées, 10 jours après l'infection. Afin de prendre en compte les variations du nombre de particules virales entre les différents inocula, les résultats d'infection ont été rapportés à la quantité de virus utilisée pour chaque infection.

III. Résultats

Dans un premier temps, cette étude nous a permis de démontrer que les clusters hydrophobes du domaine TM1 de la protéine S étaient nécessaires à l'expression de cette protéine. De plus, les délétions ne perturbant pas l'expression de la protéine, principalement celles ciblant des résidus polaires, et permettant un assemblage viral comparable à celui des virus sauvages, n'ont pas d'effet sur l'infectivité des virions suggérant que le rôle principal du domaine TM1 de la protéine S soit d'assurer une bonne expression de cette protéine.

Dans un deuxième temps, puisque les délétions introduites dans la protéine S empêchaient soit la synthèse protéique et l'assemblage viral, ou n'avaient pas d'effet sur l'infectivité des virions, nous avons analysé l'effet des mêmes mutations lorsqu'elles sont introduites dans les protéines L et M. Nous avons observé que toutes les mutations, y compris celles éliminant les clusters de résidus hydrophobes, permettaient une bonne expression des protéines ainsi que leur sécrétion. Concernant la production de virus, nous avons démontré que l'extrémité N-terminale du domaine S des protéines L et M n'était pas nécessaire à l'assemblage viral à l'exception de quatre acides aminés, ILTI, à la fin du domaine TM1 dont la délétion bloque complètement la production de particules virales complètes. De manière plus importante, nous avons identifié deux clusters d'acides aminés hydrophobes (HC), LLVL (HC1) et FLL (HC2), ainsi que deux résidus polaires adjacents, une thréonine et une arginine, dans le domaine TM1 dont la présence est indispensable pour le maintien de l'infectivité des virions.

Afin de confirmer ces résultats, et d'écartier un artéfact dû à la présence de délétions dans les protéines d'enveloppe, nous avons analysé le rôle des clusters hydrophobes et des résidus thréonine et arginine du domaine TM1 en les substituant par des alanines. Ainsi, nous avons confirmé le rôle des deux premiers clusters, HC1 et HC2, lors du processus d'infection ; démontré que le troisième cluster de résidus hydrophobes du domaine TM1, ILTI (HC3), dont la substitution en quatre alanines permet un assemblage viral contrairement à sa délétion, était

également crucial pour le maintien de l'infectivité des virions ; et enfin que la substitution des résidus thréonine et arginine par deux alanines n'affectait pas l'infectivité des virus suggérant que la nature de ces deux acides aminés ne serait pas déterminante mais que leur position qui permet d'espacer les clusters HC2 et HC3 serait importante. De façon intéressante, l'analyse de mutants supplémentaires nous a permis de démontrer que le cluster HC3 était probablement nécessaire au processus d'infection uniquement dans les protéines L et M. En effet, la substitution des deux isoleucines de ce cluster dans les protéines L et M inhibe l'infectivité des virions de plus de 90 % alors que les mêmes mutations introduites dans la protéine S n'ont pas d'effet significatif. Bien que cela doit encore être démontré pour les deux premiers clusters hydrophobe, si le domaine TM1 joue un rôle lors de l'infection uniquement dans les protéines L et M, probablement en tant que peptide de fusion, il doit agir soit sous la forme d'une boucle de fusion interne, soit être exposé à l'extrémité N-terminale des protéines grâce à un clivage protéolytique. La séquence PEST, susceptible de contenir des sites de clivage protéolytiques pourrait permettre cette exposition. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons analysé l'effet de sa délétion sur le pouvoir infectieux des virus et démontré que cette séquence n'était indispensable ni au processus d'assemblage ni au processus d'infection du VHB.

IV. Discussion

Afin d'étudier le rôle du peptide de fusion putatif et de la séquence PEST des protéines d'enveloppe lors du processus d'infection, nous avons introduit des mutations dans ces motifs soit dans la protéine S seule, soit dans les protéines L et M. Cette stratégie nous a permis d'observer que le domaine TM1 de la protéine S était important pour l'expression de cette protéine, en accord avec une étude antérieure (Prange et al, 1992). A l'opposé lorsque les mêmes délétions furent introduites dans les protéines L et M, l'expression de ces protéines ne fut pas inhibée. Compte tenu du fait que les 32 premiers résidus du domaine S ont été décrits comme un peptide signal non clivé permettant l'insertion cotraductionnelle de la protéine S dans la membrane du RE (Eble et al, 1986; Eble et al, 1987), nous n'avons pas été surpris que des mutations dans cette région affectent la synthèse ou la stabilité de la protéine S. Au contraire, il était logique que l'expression de la protéine L ne soit pas affectée puisque dans la conformation iPre-S de cette protéine, le domaine TM1 est exposé du côté cytoplasmique de la membrane du RE suggérant que son activité de transfert cotraductionnel n'est pas requise dans cette protéine.

De façon plus importante, ce travail a permis de démontrer l'importance, pour l'infectivité des virions, de trois clusters de résidus hydrophobes dans le domaine TM1 des protéines L et M. Les deux premiers clusters, HC1 et HC2, sont inclus dans la séquence du peptide de fusion putatif identifié par Rodriguez-Crepeo *et al* en 1994. L'implication du domaine

TM1 dans l'étape d'attachement ou de fusion de l'entrée virale doit cependant encore être déterminée. En effet, puisque la protéine L est probablement impliquée dans l'étape d'adsorption des virus aux cellules, et que nous ne disposons pas de test d'attachement au récepteur, toujours inconnu, nous ne pouvons exclure que nos mutations affectent cette étape initiale de l'entrée virale. Néanmoins, plusieurs arguments tels que l'hydrophobicité des résidus nécessaires à l'infection suggèrent un rôle du domaine TM1 lors du processus de fusion. Les résultats de plusieurs études antérieures sont en accord avec cette hypothèse. En effet, il a été démontré que des peptides synthétiques dont la séquence correspond aux 16 premiers acides aminés du domaine S et contient le premier cluster hydrophobe du domaine TM1, étaient capables de déstabiliser la membrane de liposomes *in vitro* (Rodriguez-Crespo et al, 1995). De plus, Berting *et al* ont démontré qu'une partie du peptide de fusion putatif, incluant également le premier cluster hydrophobe, pouvait induire un processus d'hémifusion lorsqu'elle remplaçait le peptide de fusion de la protéine HA2 (Berting et al, 2000).

De façon intéressante nous avons remarqué que les deux isoleucines du troisième cluster hydrophobe n'étaient pas indispensables à l'infectivité des virions dans la protéine S alors qu'elles l'étaient dans les protéines L et M. La protéine M n'étant pas nécessaire au processus d'infection, ces résultats suggèrent que le troisième cluster hydrophobe du domaine TM1 n'est important qu'au sein de la protéine L. Il est alors tentant d'émettre l'hypothèse que tous les clusters hydrophobes de ce domaine, bien que nécessaires à la synthèse de la protéine S et dont l'effet sur l'infectivité n'a pu être testé, ne joue un rôle dans l'entrée virale que dans la protéine L. L'insertion de mutations ponctuelles dans ces clusters, qui n'affecteraient pas la synthèse de la protéine S, permettrait de vérifier cette hypothèse. De plus, celle-ci est supportée par des résultats obtenus avec le modèle du DHBV, dont le mécanisme d'entrée virale ferait intervenir un mécanisme de fusion dépendant du domaine TM1 de la protéine L uniquement (Chojnacki et al, 2005). La position interne du peptide de fusion dans cette protéine ainsi que nos résultats qui ont exclu la nécessité d'un clivage protéolytique dans la séquence PEST suggèrent que le déterminant de l'infectivité que nous avons identifié, s'il est impliqué dans un mécanisme de fusion, agirait plutôt comme une boucle de fusion.

Pour être impliqué directement dans le processus d'entrée virale, le domaine TM1 doit pouvoir être exposé à la surface des particules virales. Cependant, les modèles actuels localisent ce domaine soit à l'intérieur des virions dans la conformation iPre-S de la protéine L, soit inséré dans la bicouche lipidique de l'enveloppe virale. L'hydrophobicité relativement faible du domaine TM1, comparée à celle d'autres domaines transmembranaires, est compatible avec l'existence de ces deux topologies. Aussi, il est possible d'imaginer que ce domaine puisse être transloqué à l'extérieur des virions lors du processus d'entrée. Cette hypothèse est supportée par

une étude de Grgacic et Schaller ayant démontré, dans le modèle du DHBV, qu'un pH acide permettait la translocation et l'exposition du domaine TM1 de la protéine L à la surface des virions (Grgacic & Schaller, 2000). Ainsi, le déterminant de l'infectivité du domaine TM1 du VHB pourrait directement interagir avec la membrane d'une cellule cible. L'analyse de la topologie de la protéine L du VHB, ainsi que la mise au point d'un test de fusion permettant de comparer la capacité de virus mutants et sauvages à induire un processus de fusion permettrait de tester ces hypothèses et constituent les perspectives de ce travail.

V. Article II

Lepère-Douard C, Trotard M, Le Seyec J, Gripon P

The First Transmembrane Domain of the Hepatitis B Virus Large Envelope Protein is Crucial for Infectivity

J Virol. 2009 Nov; 83(22):11819-29 PubMed PMID: 19740987

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Depuis la découverte de l'agent infectieux responsable des hépatites virales B, des progrès considérables ont été réalisés dans la compréhension des bases moléculaires du cycle viral du VHB. Pourtant, les premières étapes de l'infection demeurent mystérieuses. En effet, le récepteur du virus, la voie d'internalisation qu'il emprunte ainsi que le mécanisme lui permettant de libérer sa nucléocapside dans le cytoplasme des cellules infectées n'ont pas été identifiés. Contrairement à un grand nombre de virus enveloppés dont les protéines de fusion partagent plusieurs caractéristiques communes permettant leur regroupement dans trois grandes classes de protéines de fusion (Harrison, 2008), les protéines de surface du VHB semblent uniques. De ce fait, les mécanismes d'entrée remarquablement bien caractérisés pour ces trois classes de protéines, en partie grâce à la résolution de la structure tridimensionnelle des protéines de fusion, ne peuvent être transposés au cycle du VHB. Plusieurs caractéristiques des protéines d'enveloppe du VHB en font des entités originales par rapport aux autres protéines de fusion virales : (i) leur poids moléculaire modeste, (ii) leurs nombreux segments transmembranaires, (iii) la petite taille de leurs domaines extracellulaires, (iv) leur capacité à être sécrétées sous forme de particules subvirales, et (v) leur organisation extrêmement compacte dans l'enveloppe virale. Toutefois, l'étude d'un virus de la même famille infectant les canards, le DHBV, a permis de comprendre de nombreuses étapes du cycle du VHB et notamment les mécanismes complexes de la réplication virale. Concernant le processus d'entrée virale, les données disponibles sont beaucoup plus abondantes dans ce modèle animal que dans celui du VHB. En effet, le récepteur du DHBV, la carboxypeptidase D ainsi qu'un corécepteur, la gp120, ont pu être identifiés. Après leur adsorption à la surface des cellules, les virus sont internalisés et vraisemblablement transportés dans les endosomes précoces et tardifs. Ensuite, la libération des nucléocapsides dans le cytoplasme des hépatocytes infectés se ferait grâce à un mécanisme de translocation des particules virales entières à travers la membrane des endosomes (Stoeckl et al, 2006) ou grâce à un mécanisme de fusion entre l'enveloppe virale et une membrane cellulaire (Chojnacki et al, 2005). Cependant, compte tenu de la grande spécificité d'espèce des hepadnavirus et du degré de conservation relativement faible entre les protéines de surface des avi- et orthohepadnavirus, il est possible que le mécanisme d'entrée du DHBV et du VHB soit différent. Par exemple, il ne semble pas que l'homologue humain de la carboxypeptidase D soit impliqué dans le mécanisme d'entrée du VHB puisqu'aucune étude n'a pu impliquer cette molécule dans le processus d'infection du VHB. Il apparaît donc essentiel de vérifier l'ensemble des découvertes obtenues grâce au modèle du DHBV, en utilisant le modèle du VHB. Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse a été d'analyser le rôle lors de l'infection de deux motifs des protéines d'enveloppe du

	→ S	HC1	HC2	HC3
HBV (D)	PALNMENITSGFLG	PLLVLQAGFFLL	TRILTIPQSL	
DHBV (D16)	LKKKMSGTFGGILAG	LIGLLVSFFLL	IKILEILRRL	

Figure 25. Séquence des peptides de fusion du VHB et du DHBV.
 HC, Hydrophobic cluster. Source : (Chojnacki et al, 2005).

VHB, un motif de translocation (TLM) et un peptide de fusion, possiblement impliqués dans le mécanisme d'entrée du DHBV.

Dans un premier temps, nous avons analysé le rôle au cours du cycle viral, du TLM présent dans le domaine Pre-S2 des protéines L et M du VHB. Il a été suggéré que ce motif permettrait la translocation des virus entiers à travers la membrane des endosomes afin qu'ils libèrent ensuite leur nucléocapside dans le cytoplasme des cellules infectées (Stoeckl et al, 2006). De plus, les mêmes auteurs ont observé que des motifs équivalents étaient nécessaires au processus d'entrée du DHBV. Toutefois, nos résultats ont permis de démontrer que ce motif n'était pas nécessaire aux processus d'assemblage et d'infection du VHB (Lepere et al, 2007), en accord avec les conclusions de trois autres études (Blanchet & Sureau, 2007; Gudima et al, 2007; Le Seyec et al, 1998). Ainsi, ce motif nécessaire au mécanisme d'entrée du DHBV ne semble pas avoir de fonction dans les protéines d'enveloppe du VHB. Cependant, il est important de noter que la protéine L du DHBV, à la différence de celle du VHB, contient deux TLMs dans sa région Pre-S. De plus ces TLMs sont localisés dans la première moitié du domaine Pre-S de la protéine L, correspondant à la région du domaine Pre-S1 nécessaire à l'infection du VHB, entre les résidus 20-31 et 42-53 (Stoeckl et al, 2006). Au vu de ces différences, il n'est donc pas surprenant que ces motifs distants aient un rôle distinct chez le DHBV et le VHB. Si la libération des nucléocapsides dans le cytoplasme des cellules infectées ne passe pas par un mécanisme de translocation des virus entiers à travers la membrane des endosomes, un mécanisme de fusion entre l'enveloppe virale et une membrane cellulaire pourrait être impliqué.

Nous avons donc décidé d'analyser le rôle du peptide de fusion putatif des protéines d'enveloppe du VHB au cours de l'étape d'entrée virale. Ce dernier, localisé à l'extrémité N-terminale du domaine S des protéines S, M et L, présente des homologies de séquence avec les peptides de fusion des protéines de fusion de classe I (Rodriguez-Crespo et al, 1994). Sa position, N-terminale dans la protéine S et interne dans les protéines L et M nous a amené à étudier sa fonction séparément dans ces protéines. Ainsi, notre travail a permis de démontrer que trois clusters hydrophobes du domaine TM1 (AA 11-28), dont la séquence chevauche partiellement celle du peptide de fusion (AA 1-23), étaient nécessaires dans les protéines L et M pour le maintien de l'infectivité des virions. Ces clusters de quatre résidus, nommés HC1 (LLVL), HC2 (FFLL) et HC3 (ILTI) contiennent trois ou quatre acides aminés hydrophobes. Leur position et leur séquence, comme celle de l'ensemble du peptide de fusion, est conservée entre le VHB et le DHBV bien que les clusters hydrophobes dans le domaine TM1 du DHBV soient un peu plus larges (Fig. 25). Ainsi, nous avons montré que le peptide de fusion situé à l'extrémité N-terminale du domaine S des protéines L et M était nécessaire à l'étape d'infection du VHB, comme cela a été montré dans le modèle du DHBV, en accord avec l'importante

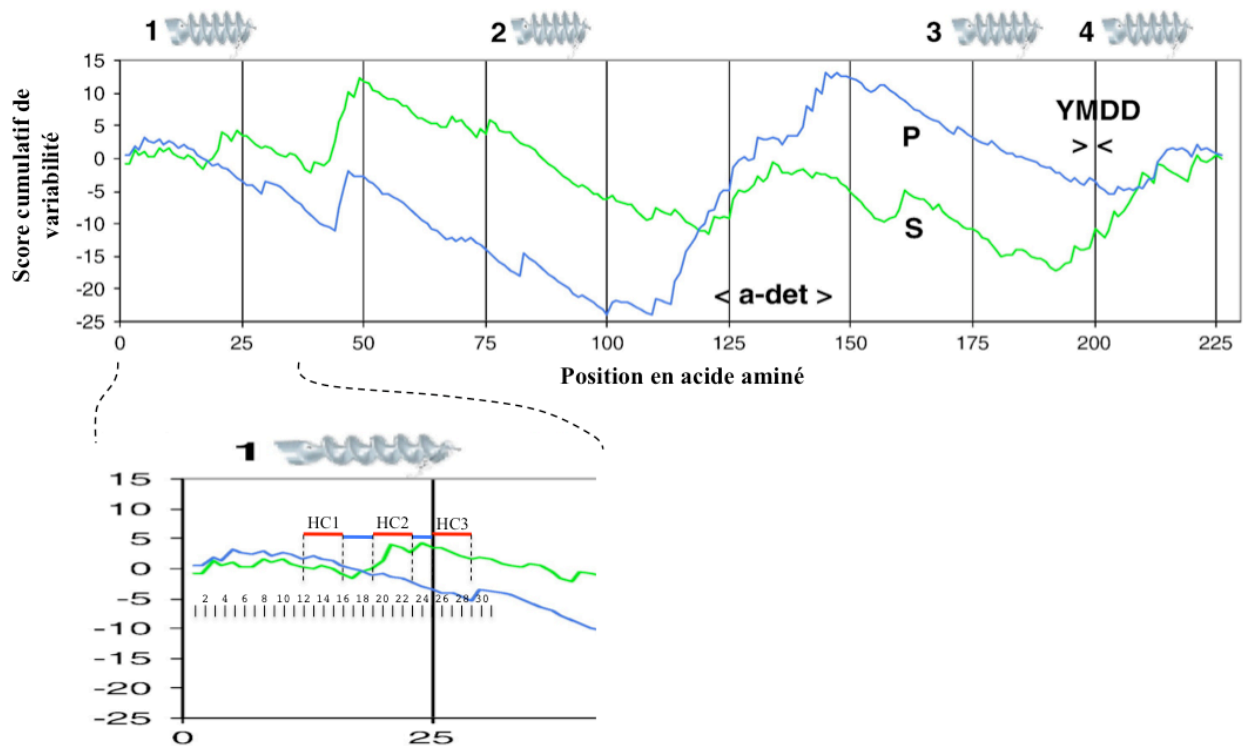


Figure 26. Taux de remplacement des acides aminés dans les protéines de surface et dans la polymérase virale. Le nombre de remplacement a été déterminé pour chaque résidu (axe des ordonnées) (van Hemert et al, 2008). Ligne bleue : Variabilité dans la séquence de la polymérase virale. Ligne verte : Variabilité dans la séquence des protéines de surface. Une pente positive indique une région soumise à une variabilité et une pente négative reflète une conservation. La position des acides aminés dans la protéine S est donnée sur l'axe des abscisses. Les hélices au dessus du graphique représentent les quatre domaines transmembranaires du domaine S. En bas : agrandissement de la région du domaine TM1. Source : (van Hemert et al, 2008).

conservation de cette région. Toutefois, bien que la conservation d'une région des protéines d'enveloppe, entre les génotypes du VHB ou entre les hepadnaviridae, puisse indiquer le rôle fondamental de cette région lors du cycle viral, il ne faut pas oublier que le cadre ouvert de lecture de la polymérase virale chevauche la totalité de celui codant pour les protéines de surface. De fait, dans la majorité des cas, lorsqu'un domaine est conservé dans la polymérase ou dans les protéines de surface, la deuxième protéine est elle aussi conservée en conséquence de la pression de sélection imposée par le domaine conservé (van Hemert et al, 2008) (Fig. 26). Cependant, cette observation n'est pas systématique puisqu'une région peut être conservée dans la polymérase et soumise à une variabilité dans les protéines de surface, ou *vice versa*. Par exemple, alors que le motif YMDD de la polymérase virale, présent au cœur du site catalytique de l'enzyme, est relativement conservé, la séquence sous-jacente dans la protéine S est sujette à une importante variation (van Hemert et al, 2008) (Fig. 26). De façon très intéressante, cette caractéristique confère probablement au site catalytique de la polymérase une liberté d'évolution, importante pour son échappement aux inhibiteurs nucléotidiques. Le même type de situation est observé dans la boucle antigénique des protéines de surface. En effet, alors que le déterminant (a) est relativement bien conservé dans ces protéines, la région sous-jacente dans la polymérase virale est soumise à une importante variabilité, permettant ainsi au déterminant (a) de s'adapter et de modifier son antigénicité en fonction de la réponse immunitaire à laquelle il est soumis. De plus, parfois, l'apparition de mutations dans la région chevauchante entre les protéines de surface et la polymérase virale peut avoir des répercussions positives sur les deux protéines influençant l'évolution de la maladie et la réponse au traitement ou à la vaccination (Torresi, 2002). Dans ce contexte, nous avons essayé d'analyser la conservation du domaine TM1 en tenant compte de la séquence de la polymérase virale sous-jacente. Nous avons pu remarquer, que sa séquence était conservée tout le long du domaine TM1 (Fig. 26). Cette observation n'est pas surprenante si l'on considère que le domaine TM1 est localisé au tout début de la région transcriptase inverse de la polymérase (juste après la région « spacer ») présentant des homologies de séquence avec la transcriptase inverse de rétrovirus tels que le VIH (Das et al, 2001). Concernant le domaine TM1 du DHBV, il est lui aussi localisé dans la région transcriptase inverse de la polymérase virale, une vingtaine d'acides aminés après la région « spacer ». Ainsi, bien qu'il soit tentant d'imaginer que la conservation de ce domaine reflète son importance au cours du cycle des hepadnaviridae, on ne peut exclure que sa séquence soit conservée à cause de celle de la polymérase virale. Toutefois, lorsque l'on observe avec attention le profil de conservation du domaine TM1 (Fig. 26, agrandissement), on remarque que ce dernier est relativement variable et que deux régions, correspondant aux clusters hydrophobes 1 et 3, sont particulièrement conservées, alors que le deuxième cluster, comme les deux régions polaires, est soumis à une variabilité relativement

importante. Ainsi, cette observation suggère que les clusters hydrophobes 1 et 3 constituent des motifs clé au sein du domaine TM1, d'où leur conservation plus importante par rapport au reste de la séquence. De façon très intéressante, ces données supportent nos résultats puisque nous avons démontré que ces deux clusters semblaient plus important pour l'infectivité que le deuxième cluster hydrophobe, et que les régions polaires n'étaient pas nécessaire au processus d'infection.

Il a été démontré que seul le peptide de fusion de la protéine L du DHBV jouait un rôle lors de l'étape d'entrée virale (Chojnacki et al, 2005), alors que la même séquence dans la protéine S n'était pas impliquée et jouait plutôt un rôle dans le maintien de la conformation et de la stabilité de la protéine (Grgacic, 2002). Des résultats comparables obtenus dans le modèle du VHB ont démontré que des délétions introduites dans le domaine TM1 de la protéine S affectaient l'expression de cette protéine (Prange et al, 1992). Ces données supportent nos résultats puisque nous avons également observé que l'introduction de délétions dans le domaine TM1 de la protéine S affectaient son expression alors que des modifications identiques introduites dans les protéines L et M n'affectaient pas l'expression de ces protéines mais inhibaient le processus d'infection. De plus, des mutations ponctuelles introduites dans le troisième cluster hydrophobe, HC3, du domaine TM1 n'affectant pas la synthèse des protéines S, M et L, ont un effet sur l'infectivité seulement lorsqu'elles sont introduites dans les protéines L et M (Lepere-Douard et al, 2009). Il semble donc que le déterminant de l'infectivité que nous avons identifié à l'extrémité N-terminale du domaine S des protéines d'enveloppe joue un rôle différent dans la protéine S d'une part où il est nécessaire à l'expression de cette protéine, et dans les protéines L et M d'autre part où il est essentiel au mécanisme d'entrée, que ce soit dans le modèle du VHB ou dans celui du DHBV. Nous pouvons également suggérer que seul le peptide de fusion de la protéine L du VHB est nécessaire au processus d'infection puisque des virus dépourvu de protéine M sont toujours infectieux (Fernholz et al, 1993). Si le déterminant de l'infectivité présent dans le domaine TM1 de la protéine L est impliqué dans un mécanisme de fusion au cours du cycle viral, il doit soit agir soit sous forme d'une boucle de fusion, comme dans les protéines de fusion de classe II et III, soit sous la forme d'un peptide de fusion N-terminal, comme dans les protéines de fusion de classe I, à condition que le domaine Pre-S le précédent ait été éliminé grâce à un clivage protéolytique. Puisque la séquence PEST, qui contient probablement plusieurs sites de clivage protéolytiques qui pourraient permettre l'exposition du peptide de fusion dans les protéine L et M (Lu et al, 1996), n'est pas indispensable au processus d'infection, il nous paraît plus probable que le peptide de fusion agisse comme une boucle de fusion. Si la conservation importante de la séquence du domaine TM1 entre les différents membres des hepadnaviridae ainsi que la conservation de son rôle lors

du processus d'infection suggèrent que ce domaine pourrait être impliqué dans une même fonction pour l'ensemble des virus de la famille, il est important de noter qu'il exerce un rôle différent chez le VHB et le DHBV dans le mécanisme de translocation du domaine Pre-S. En effet, la translocation du domaine Pre-S de la protéine L du VHB est indépendante de la protéine S et ne requiert que le domaine le TM2 de la protéine L (Lambert & Prange, 2001), alors que pour le DHBV, la translocation fait intervenir la protéine S (Grgacic et al, 2000) et son domaine TM1 (Grgacic, 2002).

Une différence de topologie entre la protéine S et les protéines L et M pourrait expliquer leur rôle différent au cours de l'entrée virale. En 2000, Grgacic et Schaller ont identifié une nouvelle topologie de la protéine L du DHBV, qui apparaît suite à un traitement des particules virales par un pH acide, et implique l'exposition du domaine TM1 à la surface des particules virales (Grgacic & Schaller, 2000). L'analyse approfondie de la topologie de la protéine L du VHB en étudiant son accessibilité à des anticorps et à des protéases constitue un des objectifs majeurs pour la poursuite de mon travail de thèse afin de comprendre comment les clusters hydrophobes du domaine TM1 pourraient être impliqués lors du processus d'infection. Une des difficultés de ce projet repose sur l'identification des conditions nécessaires à la modification de la topologie de la protéine L. De nombreux paramètres, tels que le pH, l'environnement réducteur, la présence de certains lipides, de protéines chaperon ou de corécepteurs pourraient influencer ce mécanisme. De façon intéressante, la découverte des conditions conduisant à un changement de conformation de la protéine L serait très informative quant à la nature du compartiment cellulaire au sein duquel ce changement de topologie pourrait avoir lieu. Dans la partie de l'introduction concernant la structure des protéines d'enveloppe du VHB ou du DHBV, nous avons pu voir que les modèles topologiques actuels ne représentaient probablement qu'une partie des conformations possibles des protéines d'enveloppe. Des recherches complémentaires dans ce domaine permettront très probablement de mieux comprendre le mécanisme d'entrée et peut être enfin d'expliquer le profil de glycosylation atypique de ces protéines dont seulement la moitié est glycosylée dans la boucle antigénique du domaine S. Comme cela a été démontré pour le domaine Pre-S de la protéine L, il est possible d'imaginer que le domaine S des protéines d'enveloppe soit capable d'adopter plusieurs topologies expliquant le profil de glycosylation de ces protéines, comme cela fut suggéré par des expériences de Prange *et al* en 1995 (Prange & Streeck, 1995).

Concernant l'organisation des clusters hydrophobes au sein du domaine TM1, les clusters 1 et 3 semblent plus importants pour le processus d'infection que le deuxième cluster (Lepere-Douard et al, 2009), nous nous sommes demandé quelle position ils pouvaient adopter au sein d'une structure tridimensionnelle de la protéine S, reconstituée *in silico*, dans laquelle le

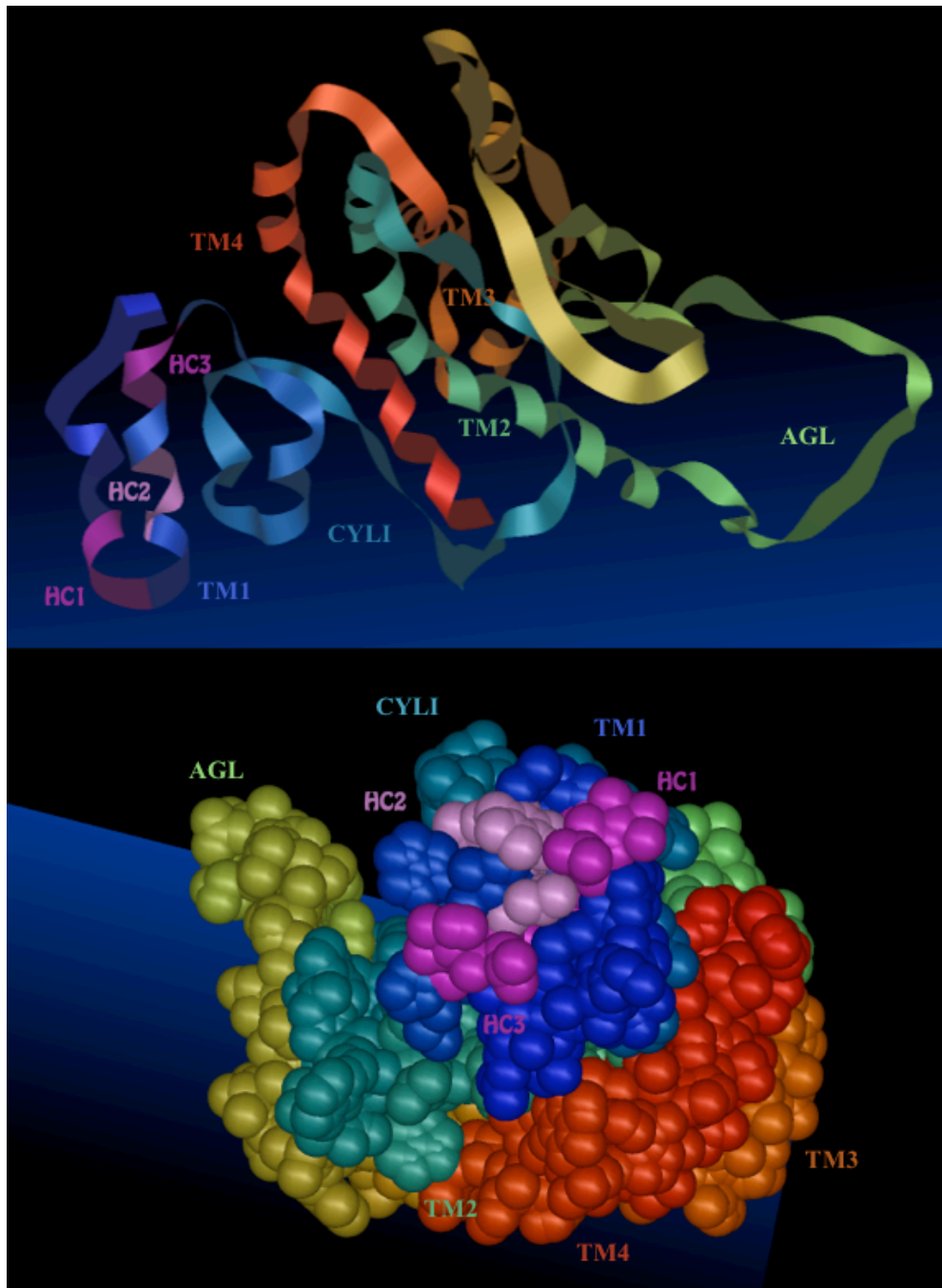


Figure 27. Modèle *in silico* de la structure 3D de la protéine S.

En haut : Représentation des structures secondaires de la protéine.

En bas : Représentation des atomes sous forme de sphères. Les différentes régions de la protéine S sont indiquées approximativement ainsi que les clusters hydrophobes (HC1, 2 et 3) du domaine TM1. Fichier source pour les reconstructions : (van Hemert et al, 2008). Logiciel : iMOL V0.4, MAC OS X.

domaine TM1 est représenté sous forme d'une boucle (van Hemert et al, 2008). Bien que ce modèle présente des limites telles que le fait de ne pas tenir compte de l'environnement lipidique des molécules, il nous a semblé intéressant que le domaine TM1 y soit représenté sous la forme d'une boucle, alors qu'un domaine plus hydrophobe tel que le domaine TM2 y est représenté sous la forme attendue d'une hélice linéaire (Fig. 27). Cependant, malgré cette conformation, les clusters 1 et 3 sont distants l'un de l'autre alors que nous aurions pu imaginer que la présence d'une boucle aurait permis leur rapprochement. Pour cela, il aurait fallu que le coude de la boucle prenne place au niveau du deuxième cluster hydrophobe moins important pour l'infectivité, et dont les deux phénylalanines peuvent être substituées par des alanines dans les protéines L et M sans affecter le processus d'infection (données non publiées). Dans cette topologie, les résidus polaires d'une part et hydrophobes d'autre part du domaine TM1 interagiraient les uns avec les autres et les clusters hydrophobes 1 et 3, sous forme d'un dimère, pourraient s'ancrer dans une membrane lipidique afin de la déstabiliser. Une autre représentation de la protéine S, dans laquelle les atomes sont schématisés par des sphères permet de visualiser la position des clusters hydrophobes à la surface de la protéine (Fig. 27). De façon intéressante, dans cette représentation, il semble que les résidus des clusters 1 et 3 soient plus exposés et regroupés à la surface de la protéine que ceux du cluster 2. Cependant, en absence de lipides, il est très difficile d'imaginer quelle topologie peut adopter le domaine TM1 et ses clusters hydrophobes. Pour que ce type d'analyse permette de comprendre comment les clusters entrent en action lors du mécanisme d'entrée virale, la résolution de la structure réelle des protéines d'enveloppe, et non seulement de la protéine S, doit être réalisée. De plus, si les protéines de surface du VHB se comportent comme les protéines de fusion connues, plusieurs structures devront être établies, avant et après le processus de fusion. La résolution de la structure tridimensionnelle des protéines par diffraction aux rayons X nécessite dans un premier temps l'obtention de cristaux de protéines. La cristallisation des protéines membranaires, telles que les protéines de surface du VHB, représente un défi majeur de la biologie structurale. En effet malgré le rôle fondamental de ces protéines dans les mécanismes biologiques, les protéines membranaires ne représentent qu'une centaine de membres parmi les milliers de structures protéiques disponibles à ce jour. La détermination des structures à l'échelle atomique des protéines membranaires se heurte aux difficultés des étapes de cristallisation plus compliquée que celle des protéines solubles et encore très mal maîtrisée (Petsko et al, 2008). Ainsi, la détermination de la structure des protéines d'enveloppe du VHB par cette technique semble compromise, compte tenu des nombreux domaines hydrophobes de ces protéines. Cependant, le poids moléculaire modeste de ces protéines permettrait peut être la résolution de leur structure par résonance magnétique nucléaire (RMN). En effet, cette technique peut être utilisée pour

résoudre la structure de protéines, relativement petites (< 50-100 kDa), dont la cristallisation est difficile, à condition que ces dernières puissent être dissoutes à des concentrations suffisamment élevées sans agrégation (Petsko et al, 2008). Contrairement aux images cristallographiques qui sont statiques, la RMN permet d'étudier la flexibilité des protéines sur une échelle de temps donnée. Les particules subviraux du VHB étant des structures compactes contenant peu de lipides (Gilbert et al, 2005), on peut imaginer que la purification de ces particules à des concentrations élevées permettrait d'analyser la structure des protéines de surface par RMN. Le développement d'un tel projet, très intéressant, nécessiterait la mise en place d'une collaboration avec des spécialistes de biologie structurale.

Des données dans la littérature suggèrent que la nature amphipatique du domaine TM1, provoquée par la présence d'un motif heptad repeat, lui permettrait d'interagir par une de ses faces avec une bicouche lipidique et ainsi peut être d'induire un mécanisme de fusion (Grgacic & Schaller, 2000; Rodriguez-Crespo et al, 1994). Cependant, nos résultats suggèrent que cette structure n'est pas impliquée dans le processus d'infection. En effet, la substitution simple ou multiple des acides aminés hydrophobes de l'heptad repeat par des alanines n'inhibe pas le processus d'infection et seul deux acides aminés de ce motif, l'isoleucine 188 et l'isoleucine 191 (numérotation dans la protéine L), situés à la fin du domaine TM1 dans le troisième cluster hydrophobe, sont nécessaires dans la protéine L pour le maintien de l'infectivité des virions. Ainsi, nous avons démontré que l'organisation des acides aminés en « clusters hydrophobes » dans le domaine TM1 était indispensable au processus d'infection contrairement à leur organisation en « heptad repeat ». La séquence située en aval du troisième cluster hydrophobe, dans la première boucle cytoplasmique, est riche en acides aminés hydrophobes aromatiques et pourrait également jouer un rôle lors de l'infection. En effet, l'analyse de la composition des peptides de fusion des protéines de fusion de classe I, II ou III révèle la présence de nombreux résidus aromatiques dans leur séquence (*cf.* chapitre « Propriétés des peptides de fusion », page 75). Afin de vérifier cette possibilité, nous avons introduit des délétions dans cette séquence. Des résultats préliminaires nous ont permis de montrer que dans les protéines L et M, certains résidus de cette région (C-terminale au domaine TM1), ne correspondant pas aux résidus aromatiques, étaient importants pour le processus d'infection. Au contraire, la même région dans la protéine S semble plutôt importante pour le processus d'assemblage viral ou pour la synthèse protéique.

Récemment, un autre motif de fusion a été identifié dans le domaine Pre-S des protéines d'enveloppe (Nunez et al, 2009). Afin de vérifier le rôle de cette région et du domaine TM1 lors d'un processus de fusion, nous souhaitons développer un test de fusion entre des particules virales purifiées et des liposomes afin de comparer la capacité de virus mutants et sauvages à induire un mécanisme de fusion. De la même façon que pour l'analyse des conditions

nécessaires au déclenchement d'un changement de conformation de la protéine L, l'identification des conditions nécessaires à l'induction d'un mécanisme de fusion entre des virus sauvages et des liposomes représente probablement la plus grande difficulté de ce travail. En effet, de nombreux paramètres, tels que le pH, l'environnement réducteur ou encore la présence de partenaires protéiques spécifiques de certains compartiments cellulaires peuvent influencer le mécanisme de fusion. En attendant les résultats des tests de fusions, plusieurs possibilités concernant le rôle des domaines Pre-S et TM1 au cours du processus de fusion peuvent être imaginées :

(i) deux peptides de fusion, un localisé dans le domaine Pre-S et l'autre dans le domaine TM1, agissent de concert pour déstabiliser la membrane d'une cellule cible ;

(ii) un des domaines reste ancré dans l'enveloppe virale alors que l'autre est envoyé dans la membrane de la cellule cible, et chaque domaine déstabilise la bicouche lipidique dans laquelle il est inséré afin de promouvoir une fusion entre ces deux membranes. En effet, il a été démontré pour les protéines de fusion connues que le domaine transmembranaire de ces protéines jouait un rôle primordial lors du mécanisme de fusion afin de rapprocher l'enveloppe virale de la membrane de la cellule cible (Harrison, 2008) ;

(iii) les deux domaines sont impliqués dans le processus de fusion, mais un d'entre eux seulement joue le rôle de peptide de fusion et l'autre est indispensable pour le changement de conformation des protéines permettant son exposition. Par exemple, suite à une réorganisation de la protéine L après l'adsorption des virus à la surface des cellules et leur internalisation, on peut imaginer que des acides aminés hydrophobes du domaine Pre-S, ou l'acide myristique situé à son extrémité N-terminale, sortent d'une poche hydrophobe générée par le domaine TM1 afin de s'insérer dans la membrane d'une cellule cible ;

(iv) le domaine Pre-S ne joue aucun rôle lors du processus de fusion et permet seulement l'attachement des virus sur leur récepteur alors que le domaine TM1, exposé à la surface des virus grâce à une réorganisation de l'enveloppe virale, est impliqué dans le processus de fusion ;

(v) les domaines Pre-S et TM1 sont impliqués dans l'étape d'adsorption des virus à la surface des cellules et ne jouent aucun rôle lors de la fusion.

Une étude très récente réalisée par Le Duff *et al*, a utilisé une stratégie originale pour démontrer que les différentes régions du domaine Pre-S1 nécessaires à l'entrée virale, à savoir l'acide myristique, les résidus 2-48 probablement impliqués dans la reconnaissance du récepteur et les résidus 48-75 possiblement impliqués dans la stabilisation de l'interaction initiale avec le récepteur, devaient agir de manière coopérative en *cis* (sur la même protéine) lors de l'entrée virale (Le Duff et al, 2009). En effet, ils ont démontré que des virus chimères dont une partie des protéines L était mutée dans une des régions précédentes et l'autre dans une région différente,

perdaient leur infectivité. Si le processus d'entrée virale nécessite une interaction entre les domaines Pre-S1 et TM1 d'une même protéine L, ce type d'expérience, à savoir la construction de virus mutants dont une partie des protéines L est délétée dans le domaine Pre-S1 et l'autre dans un cluster hydrophobe du domaine TM1, conduirait à la production de virus non infectieux. Au contraire, si ces deux régions de la protéine L sont indépendantes, une complémentation en *trans* entre les protéines L mutées permettrait d'obtenir des virus infectieux. La réalisation de telles expériences est un projet pour compléter les résultats de mon travail de thèse. En effet, de telles expériences pourraient nous permettre d'étudier d'éventuelles interactions entre le domaine Pre-S1, l'acide myristique et les clusters hydrophobes du domaine TM1.

A la vue de l'ensemble de nos résultats et des données publiées concernant le mécanisme d'entrée du DHBV, le modèle qui nous paraît le plus probable pour le mécanisme d'entrée du VHB est le suivant :

- 1) Les virus s'adsorbent à la surface des hépatocytes grâce à des liaisons de faible affinité avec des récepteurs tels que les protéoglycanes héparane sulfate. Cette interaction fait intervenir soit le domaine Pre-S1 uniquement, soit le domaine S uniquement, soit ces deux domaines simultanément.
- 2) Les virus interagissent avec un ou plusieurs récepteurs de haute affinité à la surface des hépatocytes via le domaine Pre-S1 de la protéine L. Les acides aminés 2-48 initient le processus d'interaction et les résidus 48-75 le stabilisent.
- 3) Les virus attachés à leur(s) récepteur(s) sont internalisés dans un compartiment intracellulaire dont l'environnement induit un changement de conformation des protéines d'enveloppe. Le ou les déclencheurs de ce processus sont encore inconnus et pourraient consister en un changement du pH, une activité réductrice, une composition lipidique particulière des membranes intracellulaires, ou encore en la présence d'un corécepteur dans un compartiment intracellulaire cible.
- 4) Le changement de conformation des protéines de surface permet l'exposition du domaine TM1 à la surface des particules virales, ce qui permet son interaction avec une membrane cible et sa déstabilisation conduisant à la fusion. Le domaine TM2, fortement ancré dans l'enveloppe virale grâce à son hydrophobicité importante permet le rapprochement entre la membrane cellulaire et l'enveloppe virale.
- 5) Le processus de fusion conduit à la libération des nucléocapsides dans le compartiment cytoplasmique et ces dernières sont adressées au noyau des cellules.

Bien que ce modèle soit encore théorique, l'identification de nouveaux déterminants de l'infectivité dans les protéines de surface du VHB, tels que le domaine TM1 de la protéine L ou

la boucle antigénique de la protéine S sont des découvertes récentes importantes qui permettent d'émettre de nouvelles hypothèses quant au mécanisme d'entrée adopté par le VHB. L'identification de la fonction de ces déterminants, devrait permettre de préciser le modèle proposé et constitue, pour le domaine TM1, la perspective principale de ce travail. Suite à la découverte du rôle du domaine Pre-S1 lors de l'étape d'infection, en 1999 par Le Seyec *et al* au sein de notre laboratoire (Le Seyec et al, 1999), son implication dans l'étape d'attachement au récepteur du virus a été fortement suggérée grâce à l'utilisation de peptides dérivés de ce domaine capables de bloquer le mécanisme d'infection *in vitro* (Barrera et al, 2005; Glebe et al, 2005) et *in vivo* (Petersen et al, 2008). De la même façon, maintenant que le rôle clé du domaine TM1 lors du processus d'infection a été mis en évidence, nous espérons que sa caractérisation permettra de mieux comprendre le mécanisme d'entrée du virus.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abou-Jaoude G, Sureau C (2007) Entry of hepatitis delta virus requires the conserved cysteine residues of the hepatitis B virus envelope protein antigenic loop and is blocked by inhibitors of thiol-disulfide exchange. *J Virol* **81**(23): 13057-13066
- AFSSAPS (2002) Vaccination contre l'hépatite B. *Communiqué de Presse*
- AFSSAPS, ANAES, INSERM (2004) Vaccination contre le virus de l'hépatite B et sclérose en plaques : état des lieux *Audition publique*
- Ahn SH, Park YN, Park JY, Chang HY, Lee JM, Shin JE, Han KH, Park C, Moon YM, Chon CY (2005) Long-term clinical and histological outcomes in patients with spontaneous hepatitis B surface antigen seroclearance. *J Hepatol* **42**(2): 188-194
- Albin C, Robinson WS (1980) Protein kinase activity in hepatitis B virus. *J Virol* **34**(1): 297-302
- Almeida JD, Rubenstein D, Stott EJ (1971) New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis. *Lancet* **2**(7736): 1225-1227
- Argos P (1988) A sequence motif in many polymerases. *Nucleic Acids Res* **16**(21): 9909-9916
- Awe K, Lambert C, Prange R (2008) Mammalian BiP controls posttranslational ER translocation of the hepatitis B virus large envelope protein. *FEBS Lett* **582**(21-22): 3179-3184
- Backovic M, Jardetzky TS (2009) Class III viral membrane fusion proteins. *Curr Opin Struct Biol* **19**(2): 189-196
- Bancroft WH, Mundon FK, Russell PK (1972) Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. *J Immunol* **109**(4): 842-848
- Barrera A, Guerra B, Notvall L, Lanford RE (2005) Mapping of the hepatitis B virus pre-S1 domain involved in receptor recognition. *J Virol* **79**(15): 9786-9798
- Bartenschlager R, Schaller H (1988) The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription. *Embo J* **7**(13): 4185-4192
- Bartenschlager R, Schaller H (1992) Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. *EMBO J* **11**(9): 3413-3420
- Bayer N, Schober D, Prchla E, Murphy RF, Blaas D, Fuchs R (1998) Effect of bafilomycin A1 and nocodazole on endocytic transport in HeLa cells: implications for viral uncoating and infection. *J Virol* **72**(12): 9645-9655
- Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS (1981) Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* **2**(8256): 1129-1133
- Beck J, Nassal M (2003) Efficient Hsp90-independent in vitro activation by Hsc70 and Hsp40 of duck hepatitis B virus reverse transcriptase, an assumed Hsp90 client protein. *J Biol Chem* **278**(38): 36128-36138
- Beck J, Nassal M (2007) Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* **13**(1): 48-64
- Berting A, Fischer C, Schaefer S, Garten W, Klenk HD, Gerlich WH (2000) Hemifusion activity of a chimeric influenza virus hemagglutinin with a putative fusion peptide from hepatitis B virus. *Virus research* **68**(1): 35-49
- Berting A, Hahnen J, Kroger M, Gerlich WH (1995) Computer-aided studies on the spatial structure of the small hepatitis B surface protein. *Intervirology* **38**(1-2): 8-15
- Blanchet M, Sureau C (2006) Analysis of the cytosolic domains of the hepatitis B virus envelope proteins for their function in viral particle assembly and infectivity. *J Virol* **80**(24): 11935-11945

- Blanchet M, Sureau C (2007) Infectivity determinants of the hepatitis B virus pre-S domain are confined to the N-terminal 75 amino acid residues. *J Virol* **81**(11): 5841-5849
- Blumberg BS (1977) Australia antigen and the biology of hepatitis B. *Science* **197**(4298): 17-25
- Blumberg BS (2002) The discovery of the hepatitis B virus and the invention of the vaccine: a scientific memoir. *J Gastroenterol Hepatol* **17** Suppl: S502-503
- Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S (1965) A "new" antigen in leukemia sera. *JAMA* **191**: 541-546
- Blumberg BS, Gerstley BJ, Hungerford DA, London WT, Sutnick AI (1967) A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med* **66**(5): 924-931
- Bock CT, Schranz P, Schroder CH, Zentgraf H (1994) Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell. *Virus Genes* **8**(3): 215-229
- Bock CT, Schwinn S, Locarnini S, Fyfe J, Manns MP, Trautwein C, Zentgraf H (2001) Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome. *Journal of molecular biology* **307**(1): 183-196
- Bonino F, Heermann KH, Rizzetto M, Gerlich WH (1986) Hepatitis delta virus: protein composition of delta antigen and its hepatitis B virus-derived envelope. *J Virol* **58**(3): 945-950
- Bonino F, Hoyer B, Shih JW, Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL (1984) Delta hepatitis agent: structural and antigenic properties of the delta-associated particle. *Infect Immun* **43**(3): 1000-1005
- Borel C, Sunyach C, Hantz O, Trepo C, Kay A (1998) Phosphorylation of DHBV pre-S: identification of the major site of phosphorylation and effects of mutations on the virus life cycle. *Virology* **242**(1): 90-98
- Bosch V, Bartenschlager R, Radziwill G, Schaller H (1988) The duck hepatitis B virus P-gene codes for protein strongly associated with the 5'-end of the viral DNA minus strand. *Virology* **166**(2): 475-485
- Bottcher B, Tsuji N, Takahashi H, Dyson MR, Zhao S, Crowther RA, Murray K (1998) Peptides that block hepatitis B virus assembly: analysis by cryomicroscopy, mutagenesis and transfection. *EMBO J* **17**(23): 6839-6845
- Bottcher B, Wynne SA, Crowther RA (1997) Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. *Nature* **386**(6620): 88-91
- Brandenburg B, Stockl L, Gutzeit C, Roos M, Lupberger J, Schwartlander R, Gelderblom H, Sauer IM, Hofschneider PH, Hildt E (2005) A novel system for efficient gene transfer into primary human hepatocytes via cell-permeable hepatitis B virus-like particle. *Hepatology (Baltimore, Md)* **42**(6): 1300-1309
- Brechot C, Pourcel C, Louise A, Rain B, Tiollais P (1980) Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. *Nature* **286**(5772): 533-535
- Brechot P, Saigo K, Murakami Y, Chami M, Gozuacik D, Mugnier C, Lagorce D, Brechot C (2003) Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene. *Oncogene* **22**(25): 3911-3916
- Breiner KM, Schaller H (2000) Cellular receptor traffic is essential for productive duck hepatitis B virus infection. *J Virol* **74**(5): 2203-2209
- Breiner KM, Urban S, Glass B, Schaller H (2001) Envelope protein-mediated down-regulation of hepatitis B virus receptor in infected hepatocytes. *J Virol* **75**(1): 143-150
- Breiner KM, Urban S, Schaller H (1998) Carboxypeptidase D (gp180), a Golgi-resident protein, functions in the attachment and entry of avian hepatitis B viruses. *J Virol* **72**(10): 8098-8104
- Bremer CM, Bung C, Kott N, Hardt M, Glebe D (2009) Hepatitis B virus infection is dependent on cholesterol in the viral envelope. *Cell Microbiol* **11**(2): 249-260
- Bruns M, Miska S, Chassot S, Will H (1998) Enhancement of hepatitis B virus infection by noninfectious subviral particles. *J Virol* **72**(2): 1462-1468

- Bruss V (1997) A short linear sequence in the pre-S domain of the large hepatitis B virus envelope protein required for virion formation. *J Virol* **71**(12): 9350-9357
- Bruss V (2007) Hepatitis B virus morphogenesis. *World J Gastroenterol* **13**(1): 65-73
- Bruss V, Ganem D (1991a) Mutational analysis of hepatitis B surface antigen particle assembly and secretion. *J Virol* **65**(7): 3813-3820
- Bruss V, Ganem D (1991b) The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(3): 1059-1063
- Bruss V, Gerhardt E, Vieluf K, Wunderlich G (1996a) Functions of the large hepatitis B virus surface protein in viral particle morphogenesis. *Intervirology* **39**(1-2): 23-31
- Bruss V, Hagelsten J, Gerhardt E, Galle PR (1996b) Myristylation of the large surface protein is required for hepatitis B virus in vitro infectivity. *Virology* **218**(2): 396-399
- Bruss V, Lu X, Thomssen R, Gerlich WH (1994) Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein. *EMBO J* **13**(10): 2273-2279
- Bruss V, Thomssen R (1994) Mapping a region of the large envelope protein required for hepatitis B virion maturation. *J Virol* **68**(3): 1643-1650
- Bruss V, Vieluf K (1995) Functions of the internal pre-S domain of the large surface protein in hepatitis B virus particle morphogenesis. *J Virol* **69**(11): 6652-6657
- Budkowska A, Bedossa P, Groh F, Louise A, Pillot J (1995) Fibronectin of human liver sinusoids binds hepatitis B virus: identification by an anti-idiotypic antibody bearing the internal image of the pre-S2 domain. *J Virol* **69**(2): 840-848
- Budkowska A, Maillard P, Theret N, Groh F, Possehl C, Topilko A, Crainic R (1997) Activation of the envelope proteins by a metalloproteinase enables attachment and entry of the hepatitis B virus into T-lymphocyte. *Virology* **237**(1): 10-22
- Budkowska A, Quan C, Groh F, Bedossa P, Dubreuil P, Bouvet JP, Pillot J (1993) Hepatitis-B Virus (HBV) Binding Factor in Human Serum - Candidate for a Soluble Form of Hepatocyte HBV Receptor. *J Virol* **67**(7): 4316-4322
- Bullough PA, Hughson FM, Skehel JJ, Wiley DC (1994) Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* **371**(6492): 37-43
- Calès P (2001) Vaccination anti-hépatite B et effets secondaires graves : ne pas confondre séquence et conséquence. *Gastroenterol Clin Biol* **25**: 859-862
- Cattaneo R, Will H, Hernandez N, Schaller H (1983) Signals regulating hepatitis B surface antigen transcription. *Nature* **305**(5932): 336-338
- Chai N, Chang HE, Nicolas E, Han Z, Jarnik M, Taylor J (2008) Properties of subviral particles of hepatitis B virus. *J Virol* **82**(16): 7812-7817
- Chan HL, Sung JJ (2006) Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. *Semin Liver Dis* **26**(2): 153-161
- Chang C, Zhou S, Ganem D, Standring DN (1994) Phenotypic mixing between different hepadnavirus nucleocapsid proteins reveals C protein dimerization to be cis preferential. *J Virol* **68**(8): 5225-5231
- Chang HK, Wang BY, Yuh CH, Wei CL, Ting LP (1989) A liver-specific nuclear factor interacts with the promoter region of the large surface protein gene of human hepatitis B virus. *Mol Cell Biol* **9**(11): 5189-5197
- Chang SF, Netter HJ, Bruns M, Schneider R, Frolich K, Will H (1999) A new avian hepadnavirus infecting snow geese (*Anser caerulescens*) produces a significant fraction of virions containing single-stranded DNA. *Virology* **262**(1): 39-54

- Chen PJ, Chen CR, Sung JL, Chen DS (1989) Identification of a doubly spliced viral transcript joining the separated domains for putative protease and reverse transcriptase of hepatitis B virus. *J Virol* **63**(10): 4165-4171
- Cheng KC, Smith GL, Moss B (1986) Hepatitis B virus large surface protein is not secreted but is immunogenic when selectively expressed by recombinant vaccinia virus. *J Virol* **60**(2): 337-344
- Chi SW, Kim DH, Lee SH, Chang I, Han KH (2007) Pre-structured motifs in the natively unstructured preS1 surface antigen of hepatitis B virus. *Protein Sci* **16**(10): 2108-2117
- Chien YC, Jan CF, Kuo HS, Chen CJ (2006) Nationwide hepatitis B vaccination program in Taiwan: effectiveness in the 20 years after it was launched. *Epidemiol Rev* **28**: 126-135
- Chisari FV (2000) Rous-Whipple Award Lecture. Viruses, immunity, and cancer: lessons from hepatitis B. *Am J Pathol* **156**(4): 1117-1132
- Chisari FV, Filippi P, Buras J, McLachlan A, Popper H, Pinkert CA, Palmiter RD, Brinster RL (1987) Structural and pathological effects of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(19): 6909-6913
- Chisari FV, Klopchin K, Moriyama T, Pasquinelli C, Dunsford HA, Sell S, Pinkert CA, Brinster RL, Palmiter RD (1989) Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell* **59**(6): 1145-1156
- Chisari FV, Pinkert CA, Milich DR, Filippi P, McLachlan A, Palmiter RD, Brinster RL (1985) A transgenic mouse model of the chronic hepatitis B surface antigen carrier state. *Science* **230**(4730): 1157-1160
- Cho DY, Yang GH, Ryu CJ, Hong HJ (2003) Molecular chaperone GRP78/BiP interacts with the large surface protein of hepatitis B virus in vitro and in vivo. *J Virol* **77**(4): 2784-2788
- Chojnacki J, Anderson DA, Grgacic EV (2005) A hydrophobic domain in the large envelope protein is essential for fusion of duck hepatitis B virus at the late endosome. *J Virol* **79**(23): 14945-14955
- Chouteau P, Le Seyec J, Cannie I, Nassal M, Guguen-Guillouzo C, Gripon P (2001) A short N-proximal region in the large envelope protein harbors a determinant that contributes to the species specificity of human hepatitis B virus. *J Virol* **75**(23): 11565-11572
- Clague MJ, Urbe S, Aniento F, Gruenberg J (1994) Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation. *J Biol Chem* **269**(1): 21-24
- Coffin CS, Michalak TI (1999) Persistence of infectious hepadnavirus in the offspring of woodchuck mothers recovered from viral hepatitis. *J Clin Invest* **104**(2): 203-212
- Conway JF, Cheng N, Zlotnick A, Stahl SJ, Wingfield PT, Steven AC (1998) Localization of the N terminus of hepatitis B virus capsid protein by peptide-based difference mapping from cryoelectron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(25): 14622-14627
- Conway JF, Cheng N, Zlotnick A, Wingfield PT, Stahl SJ, Steven AC (1997) Visualization of a 4-helix bundle in the hepatitis B virus capsid by cryo-electron microscopy. *Nature* **386**(6620): 91-94
- Cougot D, Neuveut C, Buendia MA (2005) HBV induced carcinogenesis. *J Clin Virol* **34 Suppl 1**: S75-78
- Courtois G, Baumhueter S, Crabtree GR (1988) Purified hepatocyte nuclear factor 1 interacts with a family of hepatocyte-specific promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(21): 7937-7941
- Crowther RA, Kiselev NA, Bottcher B, Berriman JA, Borisova GP, Ose V, Pumpens P (1994) Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell* **77**(6): 943-950
- Dane DS, Cameron CH, Briggs M (1970) Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* **1**(7649): 695-698
- Daniels D, Grytdal S, Wasley A (2009) Surveillance for acute viral hepatitis - United States, 2007. *MMWR Surveill Summ* **58**(3): 1-27

- Das K, Xiong X, Yang H, Westland CE, Gibbs CS, Sarafianos SG, Arnold E (2001) Molecular modeling and biochemical characterization reveal the mechanism of hepatitis B virus polymerase resistance to lamivudine (3TC) and emtricitabine (FTC). *J Virol* **75**(10): 4771-4779
- Dash S, Rao KVS, Panda SK (1992) Receptor for Pre-S1(21-47) Component of Hepatitis-B Virus on the Liver Cell - Role in Virus Cell Interaction. *Journal of medical virology* **37**(2): 116-121
- Daub H, Blencke S, Habenberger P, Kurtenbach A, Dennenmoser J, Wissing J, Ullrich A, Cotten M (2002) Identification of SRPK1 and SRPK2 as the major cellular protein kinases phosphorylating hepatitis B virus core protein. *J Virol* **76**(16): 8124-8137
- De Falco S, Ruvoletto M, Verdoliva A, Ruvo M, Raucci A, Marino M, Senatore S, Cassani G, Alberti A, Pontisso P, Fassina G (2001) Cloning and expression of a novel hepatitis B virus binding protein from HepG2 cells. *J Biol Chem* **276**(39): 36613-36623
- Delius H, Gough NM, Cameron CH, Murray K (1983) Structure of the hepatitis B virus genome. *J Virol* **47**(2): 337-343
- Deng Q, Zhai JW, Michel ML, Zhang J, Qin J, Kong YY, Zhang XX, Budkowska A, Tiollais P, Wang Y, Xie YH (2007) Identification and characterization of peptides that interact with hepatitis B virus via the putative receptor binding site. *J Virol* **81**(8): 4244-4254
- Desmyter J, De Groote J, Desmet VJ, Billiau A, Ray MB, Bradburne AF, Edy VG, De Somer P (1976) Administration of human fibroblast interferon in chronic hepatitis-B infection. *Lancet* **2**(7987): 645-647
- Diot C, Gripon P, Rissel M, Guguen-Guillouzo C (1992) Replication of hepatitis-B virus in differentiated adult rat hepatocytes transfected with cloned viral DNA. *Journal of medical virology* **36**(2): 93-100
- Donello JE, Beeche AA, Smith GJr, Lucero GR, Hope TJ (1996) The hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element is composed of two subelements. *J Virol* **70**(7): 4345-4351
- Dryden KA, Wieland SF, Whitten-Bauer C, Gerin JL, Chisari FV, Yeager M (2006) Native hepatitis B virions and capsids visualized by electron cryomicroscopy. *Mol Cell* **22**(6): 843-850
- Duclos-Vallee JC, Capel F, Mabit H, Petit MA (1998) Phosphorylation of the hepatitis B virus core protein by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protein kinase activity. *The Journal of general virology* **79** (Pt 7): 1665-1670
- Dunsford HA, Sell S, Chisari FV (1990) Hepatocarcinogenesis due to chronic liver cell injury in hepatitis B virus transgenic mice. *Cancer Res* **50**(11): 3400-3407
- Dyson MR, Murray K (1995) Selection of peptide inhibitors of interactions involved in complex protein assemblies: association of the core and surface antigens of hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(6): 2194-2198
- EASL (2009) EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B. *J Hepatol* **50**(2): 227-242
- Eble BE, Lingappa VR, Ganem D (1986) Hepatitis B surface antigen: an unusual secreted protein initially synthesized as a transmembrane polypeptide. *Mol Cell Biol* **6**(5): 1454-1463
- Eble BE, Lingappa VR, Ganem D (1990) The N-terminal (pre-S2) domain of a hepatitis B virus surface glycoprotein is translocated across membranes by downstream signal sequences. *J Virol* **64**(3): 1414-1419
- Eble BE, MacRae DR, Lingappa VR, Ganem D (1987) Multiple topogenic sequences determine the transmembrane orientation of the hepatitis B surface antigen. *Mol Cell Biol* **7**(10): 3591-3601
- Eckhardt SG, Milich DR, McLachlan A (1991) Hepatitis B virus core antigen has two nuclear localization sequences in the arginine-rich carboxyl terminus. *J Virol* **65**(2): 575-582
- El-Serag HB (2004) Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States. *Gastroenterology* **127**(5 Suppl 1): S27-34
- Enders GH, Ganem D, Varmus HE (1987) 5'-terminal sequences influence the segregation of ground squirrel hepatitis virus RNAs into polyribosomes and viral core particles. *J Virol* **61**(1): 35-41

- Eng FJ, Varlamov O, Fricker LD (1999) Sequences within the cytoplasmic domain of gp180/carboxypeptidase D mediate localization to the trans-Golgi network. *Mol Biol Cell* **10**(1): 35-46
- Engelke M, Mills K, Seitz S, Simon P, Gripon P, Schnolzer M, Urban S (2006) Characterization of a hepatitis B and hepatitis delta virus receptor binding site. *Hepatology (Baltimore, Md)* **43**(4): 750-760
- Enomoto M, Sawano Y, Kosuge S, Yamano Y, Kuroki K, Ohtsuki K (2006) High phosphorylation of HBV core protein by two alpha-type CK2-activated cAMP-dependent protein kinases in vitro. *FEBS Lett* **580**(3): 894-899
- Evans AA, O'Connell AP, Pugh JC, Mason WS, Shen FM, Chen GC, Lin WY, Dia A, M'Boup S, Drame B, London WT (1998) Geographic variation in viral load among hepatitis B carriers with differing risks of hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **7**(7): 559-565
- Fernholz D, Galle PR, Stemler M, Brunetto M, Bonino F, Will H (1993) Infectious Hepatitis-B Virus Variant Defective in Pre-S2 Protein Expression in a Chronic Carrier. *Virology* **194**(1): 137-148
- Ferrari C, Missale G, Boni C, Urbani S (2003) Immunopathogenesis of hepatitis B. *J Hepatol* **39 Suppl 1**: S36-42
- Foo NC, Ahn BY, Ma X, Hyun W, Yen TS (2002) Cellular vacuolization and apoptosis induced by hepatitis B virus large surface protein. *Hepatology (Baltimore, Md)* **36**(6): 1400-1407
- Fourel G, Couturier J, Wei Y, Apiou F, Tiollais P, Buendia MA (1994) Evidence for long-range oncogene activation by hepadnavirus insertion. *Embo J* **13**(11): 2526-2534
- Fourel G, Treppe C, Bougueleret L, Henglein B, Ponzetto A, Tiollais P, Buendia MA (1990) Frequent activation of N-myc genes by hepadnavirus insertion in woodchuck liver tumours [see comments]. *Nature* **347**(6290): 294-298
- Franco A, Paroli M, Testa U, Benvenuto R, Peschle C, Balsano F, Barnaba V (1992) Transferrin receptor mediates uptake and presentation of hepatitis B envelope antigen by T lymphocytes. *J Exp Med* **175**(5): 1195-1205
- Funk A, Mhamdi M, Hohenberg H, Will H, Sirma H (2006) pH-independent entry and sequential endosomal sorting are major determinants of hepadnaviral infection in primary hepatocytes. *Hepatology (Baltimore, Md)* **44**(3): 685-693
- Funk A, Mhamdi M, Lin L, Will H, Sirma H (2004) Itinerary of hepatitis B viruses: delineation of restriction points critical for infectious entry. *J Virol* **78**(15): 8289-8300
- Funk A, Mhamdi M, Will H, Sirma H (2007) Avian hepatitis B viruses: molecular and cellular biology, phylogenesis, and host tropism. *World J Gastroenterol* **13**(1): 91-103
- Gagliardi MC, Nisini R, Benvenuto R, De Petrillo G, Michel ML, Barnaba V (1994) Soluble transferrin mediates targeting of hepatitis B envelope antigen to transferrin receptor and its presentation by activated T cells. *Eur J Immunol* **24**(6): 1372-1376
- Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P (1979) Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in E. coli. *Nature* **281**(5733): 646-650
- Gallina A, Bonelli F, Zentilin L, Rindi G, Muttini M, Milanesi G (1989) A recombinant hepatitis B core antigen polypeptide with the protamine-like domain deleted self-assembles into capsid particles but fails to bind nucleic acids. *J Virol* **63**(11): 4645-4652
- Gallina A, De Koning A, Rossi F, Calogero R, Manservigi R, Milanesi G (1992) Translational modulation in hepatitis B virus preS-S open reading frame expression. *The Journal of general virology* **73**: 139-148
- Gallina A, Gazina E, Milanesi G (1995) A C-terminal PreS1 sequence is sufficient to retain hepatitis B virus L protein in 293 cells. *Virology* **213**(1): 57-69
- Ganem D (1991) Assembly of hepadnaviral virions and subviral particles. *Current topics in microbiology and immunology* **168**: 61-83
- Ganem D, Prince AM (2004) Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* **350**(11): 1118-1129

- Gavilanes F, Gonzalez-Ros JM, Peterson DL (1982) Structure of hepatitis B surface antigen. Characterization of the lipid components and their association with the viral proteins. *J Biol Chem* **257**(13): 7770-7777
- Gerelsaikhan T, Tavis JE, Bruss V (1996) Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis. *J Virol* **70**(7): 4269-4274
- Gerhardt E, Bruss V (1995) Phenotypic mixing of rodent but not avian hepadnavirus surface proteins into human hepatitis B virus particles. *J Virol* **69**(2): 1201-1208
- Gerlich WH, Kann M (2005) Hepatitis B. In *B W J Mahy and V ter Meulen (ed), Topley and Wilson's microbiology and microbial infections ASM Press, Washington, DC 2*
- Gerlich WH, Lu X, Heermann KH (1993) Studies on the Attachment and Penetration of Hepatitis-B Virus. *J Hepatol* **17**(Suppl. 3): S10-S14
- Gerlich WH, Robinson WS (1980) Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* **21**(3): 801-809
- Gerner PR, Friedt M, Oettinger R, Lausch E, Wirth S (1998) The hepatitis B virus seroconversion to anti-HBe is frequently associated with HBV genotype changes and selection of preS2-defective particles in chronically infected children. *Virology* **245**(1): 163-172
- Gilbert RJ, Beales L, Blond D, Simon MN, Lin BY, Chisari FV, Stuart DI, Rowlands DJ (2005) Hepatitis B small surface antigen particles are octahedral. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(41): 14783-14788
- Giles JP, McCollum RW, Berndtson LW, Jr., Krugman S (1969) Relation of Australia-SH antigen to the willowbrook MS-2 strain. *N Engl J Med* **281**(3): 119-122
- Glebe D (2007) Recent advances in hepatitis B virus research: a German point of view. *World J Gastroenterol* **13**(1): 8-13
- Glebe D, Aliakbari M, Krass P, Knoop EV, Valerius KP, Gerlich WH (2003) Pre-s1 antigen-dependent infection of Tupaia hepatocyte cultures with human hepatitis B virus. *J Virol* **77**(17): 9511-9521
- Glebe D, Gerlich WH (2004) Study of the endocytosis and intracellular localization of subviral particles of hepatitis B virus in primary hepatocytes. *Methods Mol Med* **96**: 143-151
- Glebe D, Urban S (2007) Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol* **13**(1): 22-38
- Glebe D, Urban S, Knoop EV, Cag N, Krass P, Grun S, Bulavaite A, Sasnauskas K, Gerlich WH (2005) Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting preS1 lipopeptides and tupaia hepatocytes. *Gastroenterology* **129**(1): 234-245
- Gocke DJ, Kavey NB (1969) Hepatitis antigen. Correlation with disease and infectivity of blood-donors. *Lancet* **1**(7605): 1055-1059
- Goldstein ST, Zhou F, Hadler SC, Bell BP, Mast EE, Margolis HS (2005) A mathematical model to estimate global hepatitis B disease burden and vaccination impact. *Int J Epidemiol* **34**(6): 1329-1339
- Gong ZJ, De Meyer S, van Pelt J, Hertogs K, Depla E, Soumillion A, Fevery J, Yap SH (1999) Transfection of a rat hepatoma cell line with a construct expressing human liver annexin V confers susceptibility to hepatitis B virus infection. *Hepatology (Baltimore, Md)* **29**(2): 576-584
- Greenberg HB, Pollard RB, Lutwick LI, Gregory PB, Robinson WS, Merigan TC (1976) Effect of human leukocyte interferon on hepatitis B virus infection in patients with chronic active hepatitis. *N Engl J Med* **295**(10): 517-522
- Grethe S, Heckel JO, Rietschel W, Hufert FT (2000) Molecular epidemiology of hepatitis B virus variants in nonhuman primates. *J Virol* **74**(11): 5377-5381

- Grgacic EV (2002) Identification of structural determinants of the first transmembrane domain of the small envelope protein of duck hepatitis B virus essential for particle morphogenesis. *The Journal of general virology* **83**(Pt 7): 1635-1644
- Grgacic EV, Anderson DA (1994) The large surface protein of duck hepatitis B virus is phosphorylated in the pre-S domain. *J Virol* **68**(11): 7344-7350
- Grgacic EV, Anderson DA (2005) St, a truncated envelope protein derived from the S protein of duck hepatitis B virus, acts as a chaperone for the folding of the large envelope protein. *J Virol* **79**(9): 5346-5352
- Grgacic EV, Kuhn C, Schaller H (2000) Hepadnavirus envelope topology: insertion of a loop region in the membrane and role of S in L protein translocation. *J Virol* **74**(5): 2455-2458
- Grgacic EV, Lin B, Gazina EV, Snooks MJ, Anderson DA (1998) Normal phosphorylation of duck hepatitis B virus L protein is dispensable for infectivity. *The Journal of general virology* **79** (Pt 11): 2743-2751
- Grgacic EV, Schaller H (2000) A metastable form of the large envelope protein of duck hepatitis B virus: low-pH release results in a transition to a hydrophobic, potentially fusogenic conformation. *J Virol* **74**(11): 5116-5122
- Gripon P, Cannie I, Urban S (2005) Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein. *J Virol* **79**(3): 1613-1622
- Gripon P, Diot C, Guguen-Guillouzo C (1993) Reproducible High Level Infection of Cultured Adult Human Hepatocytes by Hepatitis-B Virus - Effect of Polyethylene Glycol on Adsorption and Penetration. *Virology* **192**(2): 534-540
- Gripon P, Diot C, Theze N, Fourel I, Loreal O, Brechot C, Guguen-Guillouzo C (1988) Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide. *J Virol* **62**(11): 4136-4143
- Gripon P, Le Seyec J, Rumin S, Guguen-Guillouzo C (1995) Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity. *Virology* **213**(2): 292-299
- Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C, Guguen-Guillouzo C (2002) Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(24): 15655-15660
- Gudima S, Meier A, Dunbrack R, Taylor J, Bruss V (2007) Two Potentially Important Elements of the Hepatitis B Virus Large Envelope Protein are Dispensable for the Infectivity of Hepatitis Delta Virus. *J Virol*
- Guidotti LG, Matzke B, Schaller H, Chisari FV (1995) High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol* **69**(10): 6158-6159
- Guo JT, Pugh JC (1997) Topology of the large envelope protein of duck hepatitis B virus suggests a mechanism for membrane translocation during particle morphogenesis. *J Virol* **71**(2): 1107-1114
- Guo WT, Bell KD, Ou JH (1991) Characterization of the hepatitis B virus EnhI enhancer and X promoter complex. *J Virol* **65**(12): 6686-6692
- Hafner A, Brandenburg B, Hildt E (2003) Reconstitution of gene expression from a regulatory-protein-deficient hepatitis B virus genome by cell-permeable HBx protein. *EMBO reports* **4**(8): 767-773
- Hagelstein J, Fathinejad F, Stremmel W, Galle PR (1997) pH-independent uptake of hepatitis B virus in primary human hepatocytes. *Virology* **229**(1): 292-294
- Hannoun C, Krogsgaard K, Horal P, Lindh M (2002) Genotype mixtures of hepatitis B virus in patients treated with interferon. *J Infect Dis* **186**(6): 752-759
- Hantz O, Allaudeen HS, Ooka T, De Clercq E, Trepo C (1984) Inhibition of human and woodchuck hepatitis virus DNA polymerase by the triphosphates of acyclovir, 1-(2'-deoxy-2'-fluoro-beta-D-arabinofuranosyl)-5-iodocytosine and E-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine. *Antiviral Res* **4**(4): 187-199
- Hantz O, Parent R, Durantel D, Gripon P, Guguen-Guillouzo C, Zoulim F (2009) Persistence of the hepatitis B virus covalently closed circular DNA in HepaRG human hepatocyte-like cells. *The Journal of general virology* **90**(Pt 1): 127-135

- Harrison SC (2008) Viral membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* **15**(7): 690-698
- Hassan MM, Hwang LY, Hatten CJ, Swaim M, Li D, Abbruzzese JL, Beasley P, Patt YZ (2002) Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus. *Hepatology (Baltimore, Md)* **36**(5): 1206-1213
- Hatton T, Zhou S, Standing DN (1992) RNA- and DNA-binding activities in hepatitis B virus capsid protein: a model for their roles in viral replication. *J Virol* **66**(9): 5232-5241
- Havens JW (1946) Period of infectivity of patients with homologous serum jaundice and routes of infection in this disease. *J Exp Med* **83**
- Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, Seyffarth T, Baumgarten H, Gerlich WH (1984) Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J Virol* **52**(2): 396-402
- Heise T, Sommer G, Reumann K, Meyer I, Will H, Schaal H (2006) The hepatitis B virus PRE contains a splicing regulatory element. *Nucleic Acids Res* **34**(1): 353-363
- Heitz F, Morris MC, Divita G (2009) Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Br J Pharmacol* **157**(2): 195-206
- Hertogs K, Leenders WP, Depla E, De Bruin WC, Meheus L, Raymackers J, Moshage H, Yap SH (1993) Endonexin II, present on human liver plasma membranes, is a specific binding protein of small hepatitis B virus (HBV) envelope protein. *Virology* **197**(2): 549-557
- Hildt E, Munz B, Saher G, Reifenberg K, Hofschneider PH (2002) The PreS2 activator MHBs(t) of hepatitis B virus activates c-raf-1/Erk2 signaling in transgenic mice. *EMBO J* **21**(4): 525-535
- Hildt E, Saher G, Bruss V, Hofschneider PH (1996a) The hepatitis B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator. *Virology* **225**(1): 235-239
- Hildt E, Urban S, Eckerskorn C, Hofschneider PH (1996b) Isolation of highly purified, functional carboxy-terminally truncated hepatitis B virus middle surface protein activators from eucaryotic expression systems. *Hepatology (Baltimore, Md)* **24**(3): 502-507
- Hildt E, Urban S, Hofschneider PH (1995) Characterization of essential domains for the functionality of the MHBst transcriptional activator and identification of a minimal MHBst activator. *Oncogene* **11**(10): 2055-2066
- Hildt E, Urban S, Lauer U, Hofschneider PH, Kekule AS (1993) ER-localization and functional expression of the HBV transactivator MHBst. *Oncogene* **8**(12): 3359-3367
- Hirota K, Sherker AH, Omata M, Yokosuka O, Okuda K (1987) Effects of adenine arabinoside on serum and intrahepatic replicative forms of duck hepatitis B virus in chronic infection. *Hepatology (Baltimore, Md)* **7**(1): 24-28
- Hirsch RC, Lavine JE, Chang LJ, Varmus HE, Ganem D (1990) Polymerase gene products of hepatitis B viruses are required for genomic RNA packaging as well as for reverse transcription. *Nature* **344**(6266): 552-555
- Hofmann MW, Weise K, Ollesch J, Agrawal P, Stalz H, Stelzer W, Hulsbergen F, de Groot H, Gerwert K, Reed J, Langosch D (2004) De novo design of conformationally flexible transmembrane peptides driving membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(41): 14776-14781
- Hogle JM (2002) Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annu Rev Microbiol* **56**: 677-702
- Hruska JF, Clayton DA, Rubenstein JL, Robinson WS (1977) Structure of hepatitis B Dane particle DNA before and after the Dane particle DNA polymerase reaction. *J Virol* **21**(2): 666-672
- Hsu T, Moroy T, Etiemble J, Louise A, Trepo C, Tiollais P, Buendia MA (1988) Activation of c-myc by woodchuck hepatitis virus insertion in hepatocellular carcinoma. *Cell* **55**(4): 627-635
- Hu J, Flores D, Toft D, Wang X, Nguyen D (2004) Requirement of heat shock protein 90 for human hepatitis B virus reverse transcriptase function. *J Virol* **78**(23): 13122-13131

- Hu J, Seeger C (1996) Hsp90 is required for the activity of a hepatitis B virus reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(3): 1060-1064
- Hu J, Toft DO, Seeger C (1997) Hepadnavirus assembly and reverse transcription require a multi-component chaperone complex which is incorporated into nucleocapsids. *EMBO J* **16**(1): 59-68
- Hu KQ, Siddiqui A (1991) Regulation of the hepatitis B virus gene expression by the enhancer element I. *Virology* **181**(2): 721-726
- Huang J, Liang TJ (1993) A novel hepatitis B virus (HBV) genetic element with Rev response element-like properties that is essential for expression of HBV gene products. *Mol Cell Biol* **13**(12): 7476-7486
- Huang ZM, Yen TS (1994) Hepatitis B virus RNA element that facilitates accumulation of surface gene transcripts in the cytoplasm. *J Virol* **68**(5): 3193-3199
- Huovila AP, Eder AM, Fuller SD (1992) Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment. *J Cell Biol* **118**(6): 1305-1320
- Iloeje UH, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Chen CJ (2006) Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology* **130**(3): 678-686
- Imai M, Yanase Y, Nojiri T, Miyakawa Y, Mayumi M (1979) A receptor for polymerized human and chimpanzee albumins on hepatitis B virus particles co-occurring with HBeAg. *Gastroenterology* **76**(2): 242-247
- INVS (2007) Prévalence des hépatites B et C en France en 2004.
- INVS (2009) Calendrier des vaccinations et recommandations vaccinales 2009 selon l'avis du Haut conseil de la santé publique. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*
- Ishiguro R, Kimura N, Takahashi S (1993) Orientation of fusion-active synthetic peptides in phospholipid bilayers: determination by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* **32**(37): 9792-9797
- Ishihara K, Waters JA, Pignatelli M, Thomas HC (1987) Characterisation of the polymerised and monomeric human serum albumin binding sites on hepatitis B surface antigen. *Journal of medical virology* **21**(1): 89-95
- Ishikawa T, Ganem D (1995) The pre-S domain of the large viral envelope protein determines host range in avian hepatitis B viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**(14): 6259-6263
- Ishikawa T, Kuroki K, Lenhoff R, Summers J, Ganem D (1994) Analysis of the binding of a host cell surface glycoprotein to the preS protein of duck hepatitis B virus. *Virology* **202**(2): 1061-1064
- Ishikawa T, Murakami K, Kido Y, Ohnishi S, Yazaki Y, Harada F, Kuroki K (1998) Cloning, functional expression, and chromosomal localization of the human and mouse gp180-carboxypeptidase D-like enzyme. *Gene* **215**(2): 361-370
- Iwarson S, Tabor E, Thomas HC, Goodall A, Waters J, Snoy P, Shih JW, Gerety RJ (1985) Neutralization of hepatitis B virus infectivity by a murine monoclonal antibody: an experimental study in the chimpanzee. *Journal of medical virology* **16**(1): 89-96
- Jaoude GA, Sureau C (2005) Role of the antigenic loop of the hepatitis B virus envelope proteins in infectivity of hepatitis delta virus. *J Virol* **79**(16): 10460-10466
- Jean-Jean O, Levrero M, Will H, Perricaudet M, Rossignol JM (1989) Expression mechanism of the hepatitis B virus (HBV) C gene and biosynthesis of HBe antigen. *Virology* **170**(1): 99-106
- Jehn (1885) Eine Ikerusepidemie in wahrscheinlichem Zusammenhang mit vorausgegangener revaccination. *Dtsch Med Wochenschr* **11**
- Junker-Niepmann M, Bartenschlager R, Schaller H (1990) A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *Embo J* **9**(10): 3389-3396

- Kamimura T, Yoshikawa A, Ichida F, Sasaki H (1981) Electron microscopic studies of Dane particles in hepatocytes with special reference to intracellular development of Dane particles and their relation with HBeAg in serum. *Hepatology (Baltimore, Md)* **1**(5): 392-397
- Kann M, Gerlich WH (1994) Effect of core protein phosphorylation by protein kinase C on encapsidation of RNA within core particles of hepatitis B virus. *J Virol* **68**(12): 7993-8000
- Kann M, Sodeik B, Vlachou A, Gerlich WH, Helenius A (1999) Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *J Cell Biol* **145**(1): 45-55
- Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS (2000) Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* **118**(3): 554-559
- Kaplan PM, Greenman RL, Gerin JL, Purcell RH, Robinson WS (1973) DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J Virol* **12**(5): 995-1005
- Kasuya T, Nomura S, Matsuzaki T, Jung J, Yamada T, Tatematsu K, Okajima T, Tanizawa K, Kuroda S (2008) Expression of squamous cell carcinoma antigen-1 in liver enhances the uptake of hepatitis B virus envelope-derived bio-nanocapsules in transgenic rats. *FEBS J* **275**(22): 5714-5724
- Kau JH, Ting LP (1998) Phosphorylation of the core protein of hepatitis B virus by a 46-kilodalton serine kinase. *J Virol* **72**(5): 3796-3803
- Kay A, Mandart E, Trepo C, Galibert F (1985) The HBV HBX gene expressed in E. coli is recognised by sera from hepatitis patients. *Embo J* **4**(5): 1287-1292
- Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH (2002) Genetic variability in hepatitis B viruses. *The Journal of general virology* **83**(Pt 6): 1267-1280
- Kielian M, Rey FA (2006) Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin. *Nat Rev Microbiol* **4**(1): 67-76
- Klingmuller U, Schaller H (1993) Hepadnavirus infection requires interaction between the viral pre-S domain and a specific hepatocellular receptor. *J Virol* **67**(12): 7414-7422
- Kock J, Baumert TF, Delaney WEt, Blum HE, von Weizsacker F (2003) Inhibitory effect of adefovir and lamivudine on the initiation of hepatitis B virus infection in primary tupaia hepatocytes. *Hepatology (Baltimore, Md)* **38**(6): 1410-1418
- Kock J, Borst EM, Schlicht HJ (1996a) Uptake of duck hepatitis B virus into hepatocytes occurs by endocytosis but does not require passage of the virus through an acidic intracellular compartment. *J Virol* **70**(9): 5827-5831
- Kock J, Nassal M, MacNelly S, Baumert TF, Blum HE, von Weizsacker F (2001) Efficient infection of primary tupaia hepatocytes with purified human and woolly monkey hepatitis B virus. *J Virol* **75**(11): 5084-5089
- Kock J, Schlicht HJ (1993) Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity. *J Virol* **67**(8): 4867-4874
- Kock J, Theilmann L, Galle P, Schlicht HJ (1996b) Hepatitis B virus nucleic acids associated with human peripheral blood mononuclear cells do not originate from replicating virus. *Hepatology (Baltimore, Md)* **23**(3): 405-413
- Koike K, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Kyoji M (2002) Molecular mechanism of viral hepatocarcinogenesis. *Oncology* **62 Suppl 1**: 29-37
- Korba BE, Brown TL, Wells FV, Baldwin B, Cote PJ, Steinberg H, Tennant BC, Gerin JL (1990) Natural history of experimental woodchuck hepatitis virus infection: molecular virologic features of the pancreas, kidney, ovary, and testis. *J Virol* **64**(9): 4499-4506
- Korba BE, Cote PJ, Gerin JL (1988a) Mitogen-induced replication of woodchuck hepatitis virus in cultured peripheral blood lymphocytes. *Science* **241**(4870): 1213-1216
- Korba BE, Cote PJ, Shapiro M, Purcell RH, Gerin JL (1989a) In vitro production of infectious woodchuck hepatitis virus by lipopolysaccharide-stimulated peripheral blood lymphocytes. *J Infect Dis* **160**(4): 572-576

- Korba BE, Cote PJ, Wells FV, Baldwin B, Popper H, Purcell RH, Tennant BC, Gerin JL (1989b) Natural history of woodchuck hepatitis virus infections during the course of experimental viral infection: molecular virologic features of the liver and lymphoid tissues. *J Virol* **63**(3): 1360-1370
- Korba BE, Gowans EJ, Wells FV, Tennant BC, Clarke R, Gerin JL (1988b) Systemic distribution of woodchuck hepatitis virus in the tissues of experimentally infected woodchucks. *Virology* **165**(1): 172-181
- Korba BE, Wells F, Tennant BC, Cote PJ, Gerin JL (1987) Lymphoid cells in the spleens of woodchuck hepatitis virus-infected woodchucks are a site of active viral replication. *J Virol* **61**(5): 1318-1324
- Korba BE, Wells F, Tennant BC, Yoakum GH, Purcell RH, Gerin JL (1986) Hepadnavirus infection of peripheral blood lymphocytes in vivo: woodchuck and chimpanzee models of viral hepatitis. *J Virol* **58**(1): 1-8
- Krone B, Lenz A, Heermann KH, Seifer M, Lu XY, Gerlich WH (1990) Interaction between hepatitis B surface proteins and monomeric human serum albumin. *Hepatology (Baltimore, Md)* **11**(6): 1050-1056
- Kuroki K, Cheung R, Marion PL, Ganem D (1994) A Cell Surface Protein That Binds Avian Hepatitis B Virus Particles. *J Virol* **68**(4): 2091-2096
- Kuroki K, Eng F, Ishikawa T, Turck C, Harada F, Ganem D (1995) gp180, a host cell glycoprotein that binds duck hepatitis B virus particles, is encoded by a member of the carboxypeptidase gene family. *J Biol Chem* **270**(25): 15022-15028
- Kuroki K, Russnak R, Ganem D (1989) Novel N-terminal amino acid sequence required for retention of a hepatitis B virus glycoprotein in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* **9**(10): 4459-4466
- Lambert C, Prange R (2001) Dual topology of the hepatitis B virus large envelope protein: determinants influencing post-translational pre-S translocation. *J Biol Chem* **276**(25): 22265-22272
- Lambert C, Prange R (2003) Chaperone action in the posttranslational topological reorientation of the hepatitis B virus large envelope protein: Implications for translocational regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(9): 5199-5204
- Lanford RE, Chavez D, Brasky KM, Burns RB, 3rd, Rico-Hesse R (1998) Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(10): 5757-5761
- Lanford RE, Notvall L, Lee H, Beames B (1997) Transcomplementation of nucleotide priming and reverse transcription between independently expressed TP and RT domains of the hepatitis B virus reverse transcriptase. *J Virol* **71**(4): 2996-3004
- Larsen CE, Alford DR, Young LJ, McGraw TP, Duzgunes N (1990) Fusion of simian immunodeficiency virus with liposomes and erythrocyte ghost membranes: effects of lipid composition, pH and calcium. *The Journal of general virology* **71 (Pt 9)**: 1947-1955
- Larsen CE, Nir S, Alford DR, Jennings M, Lee KD, Duzgunes N (1993) Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) fusion with model membranes: kinetic analysis and the role of lipid composition, pH and divalent cations. *Biochim Biophys Acta* **1147**(2): 223-236
- Lauer U, Weiss L, Hofschneider PH, Kekule AS (1992) The hepatitis B virus pre-S/S(t) transactivator is generated by 3' truncations within a defined region of the S gene. *J Virol* **66**(9): 5284-5289
- Lavanchy D (2004) Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat* **11**(2): 97-107
- Lavillette D, Pecheur EI, Donot P, Fresquet J, Molle J, Corbau R, Dreux M, Penin F, Cosset FL (2007) Characterization of fusion determinants points to the involvement of three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus. *J Virol* **81**(16): 8752-8765
- Le Bouvier GL, McCollum RW, Hierholzer WJ, Jr., Irwin GR, Krugman S, Giles JP (1972) Subtypes of Australia antigen and hepatitis-B virus. *JAMA* **222**(8): 928-930

- Le Duff Y, Blanchet M, Sureau C (2009) The pre-S1 and antigenic loop infectivity determinants of the hepatitis B virus envelope proteins are functionally independent. *J Virol*
- Le Seyec J, Chouteau P, Cannie I, Guguen-Guillouzo C, Gripon P (1998) Role of the Pre-S2 domain of the large envelope protein in Hepatitis B Virus assembly and infectivity. *J Virol* **72**(7): 5573-5578
- Le Seyec J, Chouteau P, Cannie I, Guguen-Guillouzo C, Gripon P (1999) Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the pre-S1 domain. *J Virol* **73**(3)
- Lear JD, DeGrado WF (1987) Membrane binding and conformational properties of peptides representing the NH2 terminus of influenza HA-2. *J Biol Chem* **262**(14): 6500-6505
- Lee GH, Wasser S, Lim SG (2008) Hepatitis B pregenomic RNA splicing--the products, the regulatory mechanisms and its biological significance. *Virus research* **136**(1-2): 1-7
- Leistner CM, Gruen-Bernhard S, Glebe D (2008) Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus. *Cell Microbiol* **10**(1): 122-133
- Lepere C, Regeard M, Le Seyec J, Gripon P (2007) The translocation motif of hepatitis B virus envelope proteins is dispensable for infectivity. *J Virol* **81**(14): 7816-7818
- Lepere-Douard C, Trotard M, Le Seyec J, Gripon P (2009) The First Transmembrane Domain of the Hepatitis B Virus Large Envelope Protein is Crucial for Infectivity. *J Virol*
- Lew YY, Michalak TI (2001) In vitro and in vivo infectivity and pathogenicity of the lymphoid cell-derived woodchuck hepatitis virus. *J Virol* **75**(4): 1770-1782
- Li D, Wang XZ, Ding J, Yu JP (2005) NACA as a potential cellular target of hepatitis B virus preS1 protein. *Dig Dis Sci* **50**(6): 1156-1160
- Li J, Tong S, Lee HB, Perdigoto AL, Spangenberg HC, Wands JR (2004) Glycine decarboxylase mediates a postbinding step in duck hepatitis B virus infection. *J Virol* **78**(4): 1873-1881
- Li J, Tong S, Wands JR (1999) Identification and expression of glycine decarboxylase (p120) as a duck hepatitis B virus pre-S envelope-binding protein. *J Biol Chem* **274**(39): 27658-27665
- Li JS, Tong SP, Wands JR (1996) Characterization of a 120-kilodalton pre-S-binding protein as a candidate duck hepatitis B virus receptor. *J Virol* **70**(9): 6029-6035
- Li L, Dixon R, Gu X, JE N (1998) Comparison of the sequences of the Grey Teal, Maned Duck and Duck hepatitis B viruses. In *The Molecular biology of Hepatitis B Virus University of California San Diego* **13**
- Liaw YF, Chu CM (2009) Hepatitis B virus infection. *Lancet* **373**(9663): 582-592
- Liemann S, Chandran K, Baker TS, Nibert ML, Harrison SC (2002) Structure of the reovirus membrane-penetration protein, Mu1, in a complex with its protector protein, Sigma3. *Cell* **108**(2): 283-295
- Lien JM, Aldrich CE, Mason WS (1986) Evidence that a capped oligoribonucleotide is the primer for duck hepatitis B virus plus-strand DNA synthesis. *J Virol* **57**(1): 229-236
- Liou W, Sung YJ, Tao MH, Lo SJ (2008) Morphogenesis of the hepatitis B virion and subviral particles in the liver of transgenic mice. *J Biomed Sci* **15**(3): 311-316
- Lippincott-Schwartz J, Yuan L, Tipper C, Amherdt M, Orci L, Klausner RD (1991) Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic. *Cell* **67**(3): 601-616
- Liu J, Rost B (2003) NORSp: Predictions of long regions without regular secondary structure. *Nucleic Acids Res* **31**(13): 3833-3835
- Llovet JM, Burroughs A, Bruix J (2003) Hepatocellular carcinoma. *Lancet* **362**(9399): 1907-1917

- Loffler-Mary H, Dumortier J, Klentsch-Zimmer C, Prange R (2000) Hepatitis B virus assembly is sensitive to changes in the cytosolic S loop of the envelope proteins. *Virology* **270**(2): 358-367
- Loffler-Mary H, Werr M, Prange R (1997) Sequence-specific repression of cotranslational translocation of the hepatitis B virus envelope proteins coincides with binding of heat shock protein Hsc70. *Virology* **235**(1): 144-152
- Lofgren B, Nordenfelt E, Oberg B (1989) Inhibition of RNA- and DNA-dependent duck hepatitis B virus DNA polymerase activity by nucleoside and pyrophosphate analogs. *Antiviral Res* **12**(5-6): 301-310
- Lok AS (2002) Chronic hepatitis B. *N Engl J Med* **346**(22): 1682-1683
- Lok AS, McMahon BJ (2007) Chronic hepatitis B. *Hepatology (Baltimore, Md)* **45**(2): 507-539
- London WT, Sutnick AI, Blumberg BS (1969) Australia antigen and acute viral hepatitis. *Ann Intern Med* **70**(1): 55-59
- Lopez-Cabrera M, Letovsky J, Hu KQ, Siddiqui A (1991) Transcriptional factor C/EBP binds to and transactivates the enhancer element II of the hepatitis B virus. *Virology* **183**(2): 825-829
- Lott L, Beames B, Notvall L, Lanford RE (2000) Interaction between hepatitis B virus core protein and reverse transcriptase. *J Virol* **74**(24): 11479-11489
- Lott L, Notvall L, Lanford RE (2003) Transcomplementation of core and polymerase functions of the woolly monkey and human hepatitis B viruses. *Virology* **308**(2): 330-339
- Lu X, Block TM, Gerlich WH (1996) Protease-induced infectivity of hepatitis B virus for a human hepatoblastoma cell line. *J Virol* **70**(4): 2277-2285
- Lupberger J, Hildt E (2007) Hepatitis B virus-induced oncogenesis. *World J Gastroenterol* **13**(1): 74-81
- Lürman (1885) Eine Ikerusepidemie. *Berlin Klin Wschr* **22**: 20-23
- Mabit H, Schaller H (2000) Intracellular hepadnavirus nucleocapsids are selected for secretion by envelope protein-independent membrane binding. *J Virol* **74**(24): 11472-11478
- MacCallum FO BW (1944) Transmission of infective hepatitis to human volunteers. *Lancet* **2**: 228
- MacCullum F (1947) Homologous serum hepatitis. *Lancet* **2**: 691-692
- Machida A, Kishimoto S, Ohnuma H, Miyamoto H, Baba K, Oda K, Nakamura, T., Miyakawa Y, Mayumi M (1983) A hepatitis B surface antigen polypeptide (P31) with the receptor for polymerized human as well as chimpanzee albumins. *Gastroenterology* **85**(2): 268-274
- Machida A, Ohnuma H, Tsuda F, Yoshikawa A, Hoshi Y, Tanaka T, Kishimoto S, Akahane Y, Miyakawa Y, Mayumi M (1991) Phosphorylation in the carboxyl-terminal domain of the capsid protein of hepatitis B virus: evaluation with a monoclonal antibody. *J Virol* **65**(11): 6024-6030
- Macrae DR, Bruss V, Ganem D (1991) Myristylation of a duck hepatitis B virus envelope protein is essential for infectivity but not for virus assembly. *Virology* **181**(1): 359-363
- Madden CR, Finegold MJ, Slagle BL (2000) Expression of hepatitis B virus X protein does not alter the accumulation of spontaneous mutations in transgenic mice. *J Virol* **74**(11): 5266-5272
- Magnius LO, Espmark A (1972a) A new antigen complex co-occurring with Australia antigen. *Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol* **80**(2): 335-337
- Magnius LO, Espmark JA (1972b) New specificities in Australia antigen positive sera distinct from the Le Bouvier determinants. *J Immunol* **109**(5): 1017-1021
- Mahoney FJ (1999) Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev* **12**(2): 351-366

- Malecki J, Wiedlocha A, Wesche J, Olsnes S (2002) Vesicle transmembrane potential is required for translocation to the cytosol of externally added FGF-1. *EMBO J* **21**(17): 4480-4490
- Mandart E, Kay A, Galibert F (1984) Nucleotide sequence of a cloned duck hepatitis B virus genome: comparison with woodchuck and human hepatitis B virus sequences. *J Virol* **49**(3): 782-792
- Mangold CM, Streeck RE (1993) Mutational analysis of the cysteine residues in the hepatitis B virus small envelope protein. *J Virol* **67**(8): 4588-4597
- Mangold CM, Unckell F, Werr M, Streeck RE (1995) Secretion and antigenicity of hepatitis B virus small envelope proteins lacking cysteines in the major antigenic region. *Virology* **211**(2): 535-543
- Marion PL, Oshiro LS, Regnery DC, Scullard GH, Robinson WS (1980) A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(5): 2941-2945
- Mason WS, Seal G, Summers J (1980) Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol* **36**(3): 829-836
- Maupas P, Goudeau A, Coursaget P, Drucker J, Bagros P (1976) Immunisation against hepatitis B in man. *Lancet* **1**(7974): 1367-1370
- Maupas P, Goudeau A, Coursaget P, Drucker J, Bagros P (1978) Hepatitis B vaccine: efficacy in high-risk settings, a two-year study. *Intervirology* **10**(3): 196-208
- McDonald S (1908) Acute yellow atrophy. *Edinb Med J* **15**
- Mehdi H, Kaplan MJ, Anlar FY, Yang X, Bayer R, Sutherland K, Peeples ME (1994) Hepatitis B virus surface antigen binds to apolipoprotein H. *J Virol* **68**(4): 2415-2424
- Menne S, Cote PJ (2007) The woodchuck as an animal model for pathogenesis and therapy of chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* **13**(1): 104-124
- Meyer M, Caselmann WH, Schluter V, Schreck R, Hofschneider PH, Baeuerle PA (1992) Hepatitis B virus transactivator MHBst: activation of NF-kappa B, selective inhibition by antioxidants and integral membrane localization. *EMBO J* **11**(8): 2991-3001
- Michalak TI, Mulrooney PM, Coffin CS (2004) Low doses of hepadnavirus induce infection of the lymphatic system that does not engage the liver. *J Virol* **78**(4): 1730-1738
- Michalak TI, Pardoe IU, Coffin CS, Churchill ND, Freake DS, Smith P, Trelegan CL (1999) Occult lifelong persistence of infectious hepadnavirus and residual liver inflammation in woodchucks convalescent from acute viral hepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md)* **29**(3): 928-938
- Miller RH, Robinson WS (1984) Hepatitis B virus DNA forms in nuclear and cytoplasmic fractions of infected human liver. *Virology* **137**(2): 390-399
- Montalto G, Cervello M, Giannitrapani L, Dantona F, Terranova A, Castagnetta LA (2002) Epidemiology, risk factors, and natural history of hepatocellular carcinoma. *Ann N Y Acad Sci* **963**: 13-20
- Mulrooney PM, Michalak TI (2003) Quantitative detection of hepadnavirus-infected lymphoid cells by in situ PCR combined with flow cytometry: implications for the study of occult virus persistence. *J Virol* **77**(2): 970-979
- Mulrooney-Cousins PM, Michalak TI (2007) Persistent occult hepatitis B virus infection: experimental findings and clinical implications. *World J Gastroenterol* **13**(43): 5682-5686
- Nassal M (1992) The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly. *J Virol* **66**(7): 4107-4116
- Nassal M (2008) Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. *Virus research* **134**(1-2): 235-249
- Nassal M, Junker-Niepmann M, Schaller H (1990) Translational inactivation of RNA function: discrimination against a subset of genomic transcripts during HBV nucleocapsid assembly. *Cell* **63**(6): 1357-1363

- Naumann H, Schaefer S, Yoshida CF, Gaspar AM, Repp R, Gerlich WH (1993) Identification of a new hepatitis B virus (HBV) genotype from Brazil that expresses HBV surface antigen subtype adw4. *The Journal of general virology* **74** (Pt 8): 1627-1632
- Neefe JR SJJ, Gellis SS (1945) Homologous serum hepatitis and infectious (epidemic) hepatitis. *Am J Med Sci* **210**: 561-575
- Neurath AR, Kent SB, Parker K, Prince AM, Strick N, Brotman B, Sproul P (1986a) Antibodies to a synthetic peptide from the preS 120-145 region of the hepatitis B virus envelope are virus neutralizing. *Vaccine* **4**(1): 35-37
- Neurath AR, Kent SB, Strick N, Parker K (1986b) Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell* **46**(3): 429-436
- Neurath AR, Strick N (1990) Antigenic mimicry of an immunoglobulin A epitope by a hepatitis B virus cell attachment site. *Virology* **178**(2): 631-634
- Neurath AR, Strick N (1994) The putative cell receptors for hepatitis B virus (HBV), annexin V, and apolipoprotein H, bind to lipid components of HBV. *Virology* **204**(1): 475-477
- Neurath AR, Strick N, Li YY (1992a) Cells Transfected with Human Interleukin-6 cDNA Acquire Binding Sites for the Hepatitis-B Virus Envelope Protein. *J Exp Med* **176**(6): 1561-1569
- Neurath AR, Strick N, Sproul P (1992b) Search for hepatitis-B virus cell receptors reveals binding sites for interleukin-6 on the virus envelope protein. *J Exp Med* **175**(2): 461-469
- Newbold JE, Xin H, Tencza M, Sherman G, Dean J, Bowden S, Locarnini S (1995) The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes. *J Virol* **69**(6): 3350-3357
- Ni YH, Huang LM, Chang MH, Yen CJ, Lu CY, You SL, Kao JH, Lin YC, Chen HL, Hsu HY, Chen DS (2007) Two decades of universal hepatitis B vaccination in taiwan: impact and implication for future strategies. *Gastroenterology* **132**(4): 1287-1293
- Nordenfelt E, Lofgren B, Chattopadhyaya J, Oberg B (1987) Inhibition of hepatitis B virus DNA polymerase by 3'-azido-3'-deoxythymidine triphosphate but not by its threo analog. *Journal of medical virology* **22**(3): 231-236
- Norder H, Ebert JW, Fields HA, Mushahwar IK, Magnus LO (1996) Complete sequencing of a gibbon hepatitis B virus genome reveals a unique genotype distantly related to the chimpanzee hepatitis B virus. *Virology* **218**(1): 214-223
- Nowak MA, Bonhoeffer S, Hill AM, Boehme R, Thomas HC, McDade H (1996) Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(9): 4398-4402
- Nunez E, Yelamos B, Delgado C, Gomez-Gutierrez J, Peterson DL, Gavilanes F (2009) Interaction of preS domains of hepatitis B virus with phospholipid vesicles. *Biochim Biophys Acta* **1788**(2): 417-424
- Oess S, Hildt E (2000) Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens. *Gene therapy* **7**(9): 750-758
- Offensperger WB, Offensperger S, Walter E, Blum HE, Gerok W (1991) Inhibition of duck hepatitis B virus infection by lysosomotropic agents. *Virology* **183**(1): 415-418
- Ogata N, Cote PJ, Zanetti AR, Miller RH, Shapiro M, Gerin J, Purcell RH (1999) Licensed recombinant hepatitis B vaccines protect chimpanzees against infection with the prototype surface gene mutant of hepatitis B virus. *Hepatology (Baltimore, Md)* **30**(3): 779-786
- Okochi K, Murakami S (1968) Observations on Australia antigen in Japanese. . *Vox Sang* **15**: 374-385
- Ono Y, Onda H, Sasada R, Igarashi K, Sugino Y, Nishioka K (1983) The complete nucleotide sequences of the cloned hepatitis B virus DNA; subtype adr and adw. *Nucleic Acids Res* **11**(6): 1747-1757

- Ostapchuk P, Hearing P, Ganem D (1994) A Dramatic Shift in the Transmembrane Topology of a Viral Envelope Glycoprotein Accompanies Hepatitis B Viral Morphogenesis. *EMBO J* **13**(5): 1048-1057
- Ou JH, Rutter WJ (1987) Regulation of secretion of the hepatitis B virus major surface antigen by the preS-1 protein. *J Virol* **61**(3): 782-786
- Owada T, Matsubayashi K, Sakata H, Ihara H, Sato S, Ikebuchi K, Kato T, Azuma H, Ikeda H (2006) Interaction between desialylated hepatitis B virus and asialoglycoprotein receptor on hepatocytes may be indispensable for viral binding and entry. *J Viral Hepat* **13**(1): 11-18
- Pante N, Kann M (2002) Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol Biol Cell* **13**(2): 425-434
- Paran N, Geiger B, Shaul Y (2001) HBV infection of cell culture: evidence for multivalent and cooperative attachment. *EMBO J* **20**(16): 4443-4453
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2001) Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* **94**(2): 153-156
- Patient R, Hourieux C, Sizaret PY, Trassard S, Sureau C, Roingard P (2007) Hepatitis B virus subviral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking. *J Virol* **81**(8): 3842-3851
- Paul JR HJW, Sabin AB, Philip CB (1945) Transmission experiments in serum jaundice and infectious hepatitis. *JAMA* **128**: 911-915
- Persing DH, Varmus HE, Ganem D (1986) Inhibition of secretion of hepatitis B surface antigen by a related presurface polypeptide. *Science* **234**(4782): 1388-1391
- Persing DH, Varmus HE, Ganem D (1987) The preS1 protein of hepatitis B virus is acylated at its amino terminus with myristic acid. *J virol* **61**: 1672-1677
- Petersen J, Dandri M, Mier W, Lutgehetmann M, Volz T, von Weizsacker F, Haberkorn U, Fischer L, Pollok JM, Erbes B, Seitz S, Urban S (2008) Prevention of hepatitis B virus infection in vivo by entry inhibitors derived from the large envelope protein. *Nat Biotechnol* **26**(3): 335-341
- Peterson DL, Nath N, Gavilanes F (1982) Structure of hepatitis B surface antigen. Correlation of subtype with amino acid sequence and location of the carbohydrate moiety. *J Biol Chem* **257**(17): 10414-10420
- Petit MA, Capel F, Dubanchet S, Mabit H (1992) PreS1-Specific Binding Proteins as Potential Receptors for Hepatitis B Virus in Human Hepatocytes. *Virology* **187**(1): 211-222
- Petit MA, Pillot J (1985) HBc and HBe antigenicity and DNA-binding activity of major core protein P22 in hepatitis B virus core particles isolated from the cytoplasm of human liver cells. *J Virol* **53**(2): 543-551
- Petsko GA, Ringe D, Sanlaville C, Charlot-Bensimon D (2008) Structure et fonction des protéines. *De Boeck Université Rédacteur Dominique Charlot-Bensimon*,
- Poisson F, Roingard P, Goudeau A (1995) Le virus de l'hépatite delta : un mode de répllication bien singulier. *m/s* **11**: 1379-1387
- Poisson F, Severac A, Hourieux C, Goudeau A, Roingard P (1997) Both pre-S1 and S domains of hepatitis B virus envelope proteins interact with the core particle. *Virology* **228**(1): 115-120
- Pollack JR, Ganem D (1994) Site-specific RNA binding by a hepatitis B virus reverse transcriptase initiates two distinct reactions: RNA packaging and DNA synthesis. *J Virol* **68**(9): 5579-5587
- Pollicino T, Squadrito G, Cerenza G, Cacciola I, Raffa G, Craxi A, Farinati F, Missale G, Smedile A, Tiribelli C, Villa E, Raimondo G (2004) Hepatitis B virus maintains its pro-oncogenic properties in the case of occult HBV infection. *Gastroenterology* **126**(1): 102-110
- Ponsel D, Bruss V (2003) Mapping of amino acid side chains on the surface of hepatitis B virus capsids required for envelopment and virion formation. *J Virol* **77**(1): 416-422

- Pontisso P, Petit MA, Bankowski MJ, Peebles ME (1989a) Human liver plasma membranes contain receptors for the hepatitis B virus pre-S1 region and, via polymerized human serum albumin, for the pre-S2 region. *J Virol* **63**(5): 1981-1988
- Pontisso P, Ruvoletto MG, Gerlich WH, Heermann KH, Bardini R, Alberti A (1989b) Identification of an attachment site for human liver plasma membranes on hepatitis B virus particles. *Virology* **173**(2): 522-530
- Pontisso P, Ruvoletto MG, Tiribelli C, Gerlich WH, Ruol A, Alberti A (1992) The preS1 domain of hepatitis B virus and IgA cross-react in their binding to the hepatocyte surface. *The Journal of general virology* **73**(Pt 8): 2041-2045
- Prange R, Clemen A, Streeck RE (1991) Myristylation is involved in intracellular retention of hepatitis B virus envelope proteins. *J Virol* **65**(7): 3919-3923
- Prange R, Nagel R, Streeck RE (1992) Deletions in the hepatitis B virus small envelope protein: effect on assembly and secretion of surface antigen particles. *J Virol* **66**(10): 5832-5841
- Prange R, Streeck RE (1995) Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins. *EMBO J* **14**(2): 247-256
- Prange R, Werr M, Birkner M, Hilfrich R, Streeck RE (1995) Properties of modified hepatitis B virus surface antigen particles carrying preS epitopes. *The Journal of general virology* **76** (Pt 9): 2131-2140
- Prange R, Werr M, Löffler-Mary H (1999) Chaperones involved in hepatitis B virus morphogenesis. *Biol Chem* **380**(3): 305-314
- Prassolov A, Hohenberg H, Kalinina T, Schneider C, Cova L, Krone O, Frolich K, Will H, Sirma H (2003) New hepatitis B virus of cranes that has an unexpected broad host range. *J Virol* **77**(3): 1964-1976
- Prince AM (1968) An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **60**(3): 814-821
- Pult I, Netter HJ, Fröhlich K, Kaleta EF, Will H (1998) Identification, structural, and functional analysis of a new avian hepadnavirus from storks (STHBV). In *"The Molecular Biology of Hepatitis B viruses"* August 30-September 3, San Diego: 2
- Purcell RH, London WT, McAuliffe VJ, Palmer AE, Kaplan PM, Gerin JL, Wagner J, Popper H, Lvovsky E, Wong DC, Levy HB (1976) Modification of chronic hepatitis-B virus infection in chimpanzees by administration of an interferon inducer. *Lancet* **2**(7989): 757-761
- Rabe B, Glebe D, Kann M (2006) Lipid-mediated introduction of hepatitis B virus capsids into nonsusceptible cells allows highly efficient replication and facilitates the study of early infection events. *J Virol* **80**(11): 5465-5473
- Rabe B, Vlachou A, Pante N, Helenius A, Kann M (2003) Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(17): 9849-9854
- Radziwill G, Tucker W, Schaller H (1990) Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity. *J Virol* **64**(2): 613-620
- Rafalski M, Lear JD, DeGrado WF (1990) Phospholipid interactions of synthetic peptides representing the N-terminus of HIV gp41. *Biochemistry* **29**(34): 7917-7922
- Reaves BJ, Bright NA, Mullock BM, Luzio JP (1996) The effect of wortmannin on the localisation of lysosomal type I integral membrane glycoproteins suggests a role for phosphoinositide 3-kinase activity in regulating membrane traffic late in the endocytic pathway. *J Cell Sci* **109** (Pt 4): 749-762
- Rehermann B (2003) Immune responses in hepatitis B virus infection. *Semin Liver Dis* **23**(1): 21-38
- Rehermann B, Nascimbeni M (2005) Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* **5**(3): 215-229
- Rigg RJ, Schaller H (1992) Duck hepatitis B virus infection of hepatocytes is not dependent on low pH. *J Virol* **66**(5): 2829-2836

- Rizzetto M (2009) Hepatitis D: thirty years after. *J Hepatol* **50**(5): 1043-1050
- Robinson WS, Greenman RL (1974) DNA polymerase in the core of the human hepatitis B virus candidate. *J Virol* **13**(6): 1231-1236
- Rodriguez-Crespo I, Gomez-Gutierrez J, Encinar JA, Gonzalez-Ros JM, Albar JP, Peterson DL, Gavilanes F (1996) Structural properties of the putative fusion peptide of hepatitis B virus upon interaction with phospholipids. Circular dichroism and Fourier-transform infrared spectroscopy studies. *Eur J Biochem* **242**(2): 243-248
- Rodriguez-Crespo I, Gomez-Gutierrez J, Nieto M, Peterson DL, Gavilanes F (1994) Prediction of a putative fusion peptide in the S protein of hepatitis B virus. *The Journal of general virology* **75** (Pt 3): 637-639
- Rodriguez-Crespo I, Nunez E, Gomez-Gutierrez J, Yelamos B, Albar JP, Peterson DL, Gavilanes F (1995) Phospholipid interactions of the putative fusion peptide of hepatitis B virus surface antigen S protein. *The Journal of general virology* **76**(Pt 2): 301-308
- Rodriguez-Crespo I, Nunez E, Yelamos B, Gomez-Gutierrez J, Albar JP, Peterson DL, Gavilanes F (1999) Fusogenic activity of hepadnavirus peptides corresponding to sequences downstream of the putative cleavage site. *Virology* **261**(1): 133-142
- Roingard P, Lu SL, Sureau C, Freschlin M, Arbeille B, Essex M, Romet-Lemonne JL (1990) Immunocytochemical and electron microscopic study of hepatitis B virus antigen and complete particle production in hepatitis B virus DNA transfected HepG2 cells. *Hepatology (Baltimore, Md)* **11**(2): 277-285
- Roingard P, Sureau C (1998) Ultrastructural analysis of hepatitis B virus in HepG2-transfected cells with special emphasis on subviral filament morphogenesis. *Hepatology (Baltimore, Md)* **28**(4): 1128-1133
- Rosmorduc O, Petit MA, Pol S, Capel F, Bortolotti F, Berthelot P, Brechot C, Kremsdorf D (1995) In vivo and in vitro expression of defective hepatitis B virus particles generated by spliced hepatitis B virus RNA. *Hepatology (Baltimore, Md)* **22**(1): 10-19
- Rost B, Fariselli P, Casadio R (1996) Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86% accuracy. *Protein Sci* **5**(8): 1704-1718
- Rothmann K, Schnolzer M, Radziwill G, Hildt E, Moelling K, Schaller H (1998) Host cell-virus cross talk: phosphorylation of a hepatitis B virus envelope protein mediates intracellular signaling. *J Virol* **72**(12): 10138-10147
- Russnak R, Ganem D (1990) Sequences 5' to the polyadenylation signal mediate differential poly(A) site use in hepatitis B viruses. *Genes Dev* **4**(5): 764-776
- Ryu CJ, Cho DY, Gripon P, Kim HS, Guguen-Guillouzo C, Hong HJ (2000) An 80-kilodalton protein that binds to the pre-S1 domain of hepatitis B virus. *J Virol* **74**(1): 110-116
- Saher G, Hildt E (1999) Activation of c-Raf-1 kinase signal transduction pathway in alpha(7) integrin-deficient mice. *J Biol Chem* **274**(39): 27651-27657
- Salisse J, Sureau C (2009) A function essential to viral entry underlies the hepatitis B virus "a" determinant. *J Virol*
- Santantonio T, Jung MC, Schneider R, Fernholz D, Milella M, Monno L, Pastore G, Pape GR, Will H (1992) Hepatitis-B Virus Genomes That Cannot Synthesize Pre-S2 Proteins Occur Frequently and as Dominant Virus Populations in Chronic Carriers in Italy. *Virology* **188**(2): 948-952
- Satoh O, Imai H, Yoneyama T, Miyamura T, Utsumi H, Inoue K, Umeda M (2000) Membrane structure of the hepatitis B virus surface antigen particle. *J Biochem* **127**(4): 543-550
- Sattler F, Robinson WS (1979) Hepatitis B viral DNA molecules have cohesive ends. *J Virol* **32**(1): 226-233
- Schaefer S (2005) Hepatitis B virus: significance of genotypes. *J Viral Hepat* **12**(2): 111-124
- Schaefer S (2007) Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol* **13**(1): 14-21

- Schlicht HJ, Bartenschlager R, Schaller H (1989) The duck hepatitis B virus core protein contains a highly phosphorylated C terminus that is essential for replication but not for RNA packaging. *J Virol* **63**(7): 2995-3000
- Schluter V, Meyer M, Hofschneider PH, Koshy R, Caselmann WH (1994) Integrated hepatitis B virus X and 3' truncated preS/S sequences derived from human hepatomas encode functionally active transactivators. *Oncogene* **9**(11): 3335-3344
- Schmitt S, Glebe D, Tolle TK, Lochnit G, Linder D, Geyer R, Gerlich WH (2004) Structure of pre-S2 N- and O-linked glycans in surface proteins from different genotypes of hepatitis B virus. *The Journal of general virology* **85**(Pt 7): 2045-2053
- Schmut N (2006) Analysis of Carboxypeptidase D-independent and -dependent steps in the duck hepatitis B virus infection. <http://www.u-b.uni-heidelberg.de/archiv/6552>
- Schulze A, Gripon P, Urban S (2007) Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology (Baltimore, Md)* **46**(6): 1759-1768
- Schwalbe M, Ohlenschlager O, Marchanka A, Ramachandran R, Hafner S, Heise T, Gorlach M (2008) Solution structure of stem-loop alpha of the hepatitis B virus post-transcriptional regulatory element. *Nucleic Acids Res* **36**(5): 1681-1689
- Sebton M (2004) Risques, Sécurité sanitaire et processus de décision. *Collection Médecine des Risques Edité par Elsevier SAS*
- Seeger C, Ganem D, Varmus HE (1986) Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science* **232**(4749): 477-484
- Seeger C, Zoulim F, Mason WS (2007) Hepadnaviruses. In *D M Knipe (ed), Fields virology, 5th ed Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA: 2977-3030*
- Seifer M, Zhou S, Standing DN (1993) A micromolar pool of antigenically distinct precursors is required to initiate cooperative assembly of hepatitis B virus capsids in *Xenopus* oocytes. *J Virol* **67**(1): 249-257
- Seitz S, Urban S, Antoni C, Bottcher B (2007) Cryo-electron microscopy of hepatitis B virions reveals variability in envelope capsid interactions. *EMBO J* **26**(18): 4160-4167
- Senior JR, Sutnick AI, Goeser E, London WT, Dahlke MB, Blumberg BS (1974) Reduction of post-transfusion hepatitis by exclusion of Australia antigen from donor blood in an urban public hospital. *Am J Med Sci* **267**(3): 171-177
- Shaul Y, Rutter WJ, Laub O (1985) A human hepatitis B viral enhancer element. *Embo J* **4**(2): 427-430
- Shearer MH, Sureau C, Dunbar B, Kennedy RC (1998) Structural characterization of viral neutralizing monoclonal antibodies to hepatitis B surface antigen. *Mol Immunol* **35**(18): 1149-1160
- Sheu SY, Lo SJ (1992) Preferential ribosomal scanning is involved in the differential synthesis of the hepatitis B viral surface antigens from subgenomic transcripts. *Virology* **188**(1): 353-357
- Shibuya K, Mathers CD, Boschi-Pinto C, Lopez AD, Murray CJ (2002) Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: II. Results for the global burden of disease 2000. *BMC Cancer* **2**: 37
- Shih CH, Li LS, Roychoudhury S, Ho MH (1989) In vitro propagation of human hepatitis B virus in a rat hepatoma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(16): 6323-6327
- Shiina S, Fujino H, Kawabe T, Tagawa K, Unuma T, Yoneyama M, Ohmori T, Suzuki S, Kurita M, Ohashi Y (1991a) Relationship of HBsAg subtypes with HBeAg/anti-HBe status and chronic liver disease. Part II: Evaluation of epidemiological factors and suspected risk factors of liver dysfunction. *Am J Gastroenterol* **86**(7): 872-875
- Shiina S, Fujino H, Uta Y, Tagawa K, Unuma T, Yoneyama M, Ohmori T, Suzuki S, Kurita M, Ohashi Y (1991b) Relationship of HBsAg subtypes with HBeAg/anti-HBe status and chronic liver disease. Part I: Analysis of 1744 HBsAg carriers. *Am J Gastroenterol* **86**(7): 866-871

- Simon K, Lingappa VR, Ganem D (1988) Secreted hepatitis B surface antigen polypeptides are derived from a transmembrane precursor. *J Cell Biol* **107**(6 Pt 1): 2163-2168
- Sirma H, Weil R, Rosmorduc O, Urban S, Israel A, Kremsdorf D, Brechot C (1998) Cytosol is the prime compartment of hepatitis B virus X protein where it colocalizes with the proteasome. *Oncogene* **16**(16): 2051-2063
- Sobotta D, Sominskaya I, Jansons J, Meisel H, Schmitt S, Heermann KH, Kaluza G, Pumpens P, Gerlich WH (2000) Mapping of immunodominant B-cell epitopes and the human serum albumin-binding site in natural hepatitis B virus surface antigen of defined genosubtype. *The Journal of general virology* **81**(Pt 2): 369-378
- Sonawane ND, Thiagarajah JR, Verkman AS (2002) Chloride concentration in endosomes measured using a ratioable fluorescent Cl⁻ indicator: evidence for chloride accumulation during acidification. *J Biol Chem* **277**(7): 5506-5513
- Spangenberg HC, Lee HB, Li J, Tan F, Skidgel R, Wands JR, Tong S (2001) A short sequence within domain C of duck carboxypeptidase D is critical for duck hepatitis B virus binding and determines host specificity. *J Virol* **75**(22): 10630-10642
- Sprengel R, Kaleta EF, Will H (1988) Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J Virol* **62**(10): 3832-3839
- Sprengel R, Kuhn C, Will H, Schaller H (1985) Comparative sequence analysis of duck and human hepatitis B virus genomes. *Journal of medical virology* **15**(4): 323-333
- Staib F, Hussain SP, Hofseth LJ, Wang XW, Harris CC (2003) TP53 and liver carcinogenesis. *Hum Mutat* **21**(3): 201-216
- Standring DN, Ou JH, Masiarz FR, Rutter WJ (1988) A signal peptide encoded within the precore region of hepatitis B virus directs the secretion of a heterogeneous population of e antigens in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(22): 8405-8409
- Standring DN, Ou JH, Rutter WJ (1986) Assembly of viral particles in *Xenopus* oocytes: pre-surface-antigens regulate secretion of the hepatitis B viral surface envelope particle. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**(24): 9338-9342
- Standring DN, Rutter WJ, Varmus HE, Ganem D (1984) Transcription of the hepatitis B surface antigen gene in cultured murine cells initiates within the presurface region. *J Virol* **50**(2): 563-571
- Stibbe W, Gerlich WH (1983) Structural relationships between minor and major proteins of hepatitis B surface antigen. *J Virol* **46**(2): 626-628
- Stirk HJ, Thornton JM, Howard CR (1992) A topological model for hepatitis B surface antigen. *Intervirology* **33**(3): 148-158
- Stoeckl L, Funk A, Kopitzki A, Brandenburg B, Oess S, Will H, Sirma H, Hildt E (2006) Identification of a structural motif crucial for infectivity of hepatitis B viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(17): 6730-6734
- Su TS, Lai CJ, Huang JL, Lin LH, Yauk YK, Chang CM, Lo SJ, Han SH (1989a) Hepatitis B virus transcript produced by RNA splicing. *J Virol* **63**(9): 4011-4018
- Su TS, Lui WY, Lin LH, Han SH, FK Pe (1989b) Analysis of hepatitis B virus transcripts in infected human livers. *Hepatology (Baltimore, Md)* **9**(2): 180-185
- Sumi H, Yokosuka O, Seki N, Arai M, Imazeki F, Kurihara T, Kanda T, Fukai K, Kato M, Saisho H (2003) Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md)* **37**(1): 19-26
- Summers J, Mason WS (1982) Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* **29**(2): 403-415
- Summers J, O'Connell A, Millman I (1975) Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(11): 4597-4601

- Summers J, Smith PM, Horwich AL (1990) Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification. *J Virol* **64**(6): 2819-2824
- Summers J, Smolec JM, Snyder R (1978) A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(9): 4533-4537
- Sureau C, Guerra B, Lee H (1994) The middle hepatitis B virus envelope protein is not necessary for infectivity of hepatitis delta virus. *J Virol* **68**(6): 4063-4066
- Suzuki T, Masui N, Kajino K, Saito I, Miyamura T (1989) Detection and mapping of spliced RNA from a human hepatoma cell line transfected with the hepatitis B virus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(21): 8422-8426
- Swameye I, Schaller H (1997) Dual topology of the large envelope protein of duck hepatitis B virus: determinants preventing pre-S translocation and glycosylation. *J Virol* **71**(12): 9434-9441
- Tabor E, Purcell RH, London WT, Gerety RJ (1983) Use of and interpretation of results using inocula of hepatitis B virus with known infectivity titers. *J Infect Dis* **147**(3): 531-534
- Takada S, Kaneniwa N, Tsuchida N, Koike K (1996) Hepatitis B virus X gene expression is activated by X protein but repressed by p53 tumor suppressor gene product in the transient expression system. *Virology* **216**(1): 80-89
- Tang H, Oishi N, Kaneko S, Murakami S (2006) Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein. *Cancer Sci* **97**(10): 977-983
- Tao PZ, Lofgren B, Lake-Bakaar D, Johansson NG, Datema R, Oberg B (1988) Inhibition of human hepatitis B virus DNA polymerase and duck hepatitis B virus DNA polymerase by triphosphates of thymidine analogs and pharmacokinetic properties of the corresponding nucleosides. *Journal of medical virology* **26**(4): 353-362
- Testut P, Renard CA, Terradillos O, Vitvitski-Trepo L, Tekaiia F, Degott C, Blake J, Boyer B, Buendia MA (1996) A new hepadnavirus endemic in arctic ground squirrels in Alaska. *J Virol* **70**(7): 4210-4219
- Thakur V, Guptan RC, Kazim SN, Malhotra V, Sarin SK (2002) Profile, spectrum and significance of HBV genotypes in chronic liver disease patients in the Indian subcontinent. *J Gastroenterol Hepatol* **17**(2): 165-170
- Thorgeirsson SS, Grisham JW (2002) Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* **31**(4): 339-346
- Thung SN, Wang DF, Fasy TM, Hood A, Gerber MA (1989) Hepatitis B surface antigen binds to human serum albumin cross-linked by transglutaminase. *Hepatology (Baltimore, Md)* **9**(5): 726-730
- Tiollais P, Wain-Hobson S (1984) In *Chisari, FV (ed), Advances in Hepatitis B Research Masson Publishing, New York, NY*: 9-20
- Tong S, Li J, Wands JR (1995) Interaction between duck hepatitis B virus and a 170-kilodalton cellular protein is mediated through a neutralizing epitope of the pre-S region and occurs during viral infection. *J Virol* **69**(11): 7106-7112
- Tong SP, Diot C, Gripon P, Li J, Vitvitski L, Trepo C, Guguen-Guillouzo C (1991) In vitro replication competence of a cloned hepatitis B virus variant with a nonsense mutation in the distal pre-C region. *Virology* **181**(2): 733-737
- Torresi J (2002) The virological and clinical significance of mutations in the overlapping envelope and polymerase genes of hepatitis B virus. *J Clin Virol* **25**(2): 97-106
- Treichel U, Meyer zum Buschenfelde KH, Dienes HP, Gerken G (1997) Receptor-mediated entry of hepatitis B virus particles into liver cells. *Arch Virol* **142**(3): 493-498
- Treichel U, Zumbuschenfelde KHM, Stockert RJ, Poralla T, Gerken G (1994) The asialoglycoprotein receptor mediates hepatic binding and uptake of natural hepatitis B virus particles derived from viraemic carriers. *The Journal of general virology* **75**(Part 11): 3021-3029
- Tsubota A, Arase Y, Ren F, Tanaka H, Ikeda K, Kumada H (2001) Genotype may correlate with liver carcinogenesis and tumor characteristics in cirrhotic patients infected with hepatitis B virus subtype adw. *Journal of medical virology* **65**(2): 257-265

- Tur-Kaspa R, Burk RD, Shaul Y, Shafritz DA (1986) Hepatitis B virus DNA contains a glucocorticoid-responsive element. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(6): 1627-1631
- Tur-Kaspa R, Shaul Y, Moore DD, Burk RD, Okret S, Poellinger L, Shafritz DA (1988) The glucocorticoid receptor recognizes a specific nucleotide sequence in hepatitis B virus DNA causing increased activity of the HBV enhancer. *Virology* **167**(2): 630-633
- Tuttleman JS, Pourcel C, Summers J (1986) Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell* **47**(3): 451-460
- Twu JS, Schloemer RH (1987) Transcriptional trans-activating function of hepatitis B virus. *J Virol* **61**(11): 3448-3453
- Ueda K, Tsurimoto T, Matsubara K (1991) Three envelope proteins of hepatitis B virus: large S, middle S, and major S proteins needed for the formation of Dane particles. *J Virol* **65**(7): 3521-3529
- Urban S (2004) Binding of duck carboxypeptidase D to duck hepatitis B virus. *Methods Mol Med* **95**: 199-212
- Urban S, Breiner KM, Fehler F, Klingmuller U, Schaller H (1998) Avian hepatitis B virus infection is initiated by the interaction of a distinct pre-S subdomain with the cellular receptor gp180. *J Virol* **72**(10): 8089-8097
- Urban S, Gripon P (2002) Inhibition of duck hepatitis B virus infection by a myristoylated pre-S peptide of the large viral surface protein. *J Virol* **76**(4): 1986-1990
- Urban S, Kruse C, Multhaup G (1999) A soluble form of the avian hepatitis B virus receptor. Biochemical characterization and functional analysis of the receptor ligand complex. *J Biol Chem* **274**(9): 5707-5715
- Urban S, Schwarz C, Marx UC, Zentgraf H, Schaller H, Multhaup G (2000) Receptor recognition by a hepatitis B virus reveals a novel mode of high affinity virus-receptor interaction. *EMBO J* **19**(6): 1217-1227
- van Hemert FJ, Zaaier HL, Berkhout B, Lukashov VV (2008) Mosaic amino acid conservation in 3D-structures of surface protein and polymerase of hepatitis B virus. *Virology* **370**(2): 362-372
- Vaudin M, Wolstenholme AJ, Tsiquaye KN, Zuckerman AJ, Harrison TJ (1988) The complete nucleotide sequence of the genome of a hepatitis B virus isolated from a naturally infected chimpanzee. *The Journal of general virology* **69 (Pt 6)**: 1383-1389
- Visvanathan K, Lewin SR (2006) Immunopathogenesis: role of innate and adaptive immune responses. *Semin Liver Dis* **26**(2): 104-115
- von Weizsacker F, Kock J, MacNelly S, Ren S, Blum HE, Nassal M (2004) The tupaia model for the study of hepatitis B virus: direct infection and HBV genome transduction of primary tupaia hepatocytes. *Methods Mol Med* **96**: 153-161
- von Weizsacker F, Wieland S, Blum HE (1995) Identification of two separable modules in the duck hepatitis B virus core protein. *J Virol* **69**(4): 2704-2707
- Walter E, Keist R, Niederost B, Pult I, Blum HE (1996) Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo. *Hepatology (Baltimore, Md)* **24**(1): 1-5
- Wang GH, Seeger C (1993) Novel mechanism for reverse transcription in hepatitis B viruses. *J Virol* **67**(11): 6507-6512
- Wang J, Lee AS, Ou JH (1991) Proteolytic conversion of hepatitis B virus e antigen precursor to end product occurs in a postendoplasmic reticulum compartment. *J Virol* **65**(9): 5080-5083
- Wang X, Grammatikakis N, Hu J (2002) Role of p50/CDC37 in hepadnavirus assembly and replication. *J Biol Chem* **277**(27): 24361-24367
- Waris G, Siddiqui A (2003) Regulatory mechanisms of viral hepatitis B and C. *J Biosci* **28**(3): 311-321

- Warren KS, Heeney JL, Swan RA, Heriyanto, Verschoor EJ (1999) A new group of hepadnaviruses naturally infecting orangutans (*Pongo pygmaeus*). *J Virol* **73**(9): 7860-7865
- Watanabe T, Sorensen EM, Naito A, Schott M, Kim S, Ahlquist P (2007) Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(24): 10205-10210
- Wei Y, Fourel G, Ponzetto A, Silvestro M, Tiollais P, Buendia MA (1992) Hepadnavirus integration: mechanisms of activation of the N-myc2 retrotransposon in woodchuck liver tumors. *J Virol* **66**(9): 5265-5276
- Wei Y, Tavis JE, Ganem D (1996) Relationship between viral DNA synthesis and virion envelopment in hepatitis B viruses. *J Virol* **70**(9): 6455-6458
- Weller IV, Carreno V, Fowler MJ, Monjardino J, Makinen D, Thomas HC, Sherlock S (1982) Acyclovir inhibits hepatitis B virus replication in man. *Lancet* **1**(8266): 273
- Werr M, Prange R (1998) Role for calnexin and N-linked glycosylation in the assembly and secretion of hepatitis B virus middle envelope protein particles. *J Virol* **72**(1): 778-782
- WHO (1991) Rapport du 14ème Groupe consultatif mondial. *WHO/EPI/GEN/921*
- WHO (1993) Rapport d'activités pour l'année 1992. Englobant les recommandations formulées par le groupe consultatif mondial en octobre 1992. *WHO/EPI/GEN/931*
- WHO. (2002) Hepatitis B. In response Docdsa (ed.), *WHO/CDS/CSR/LYO/2002.2:Hepatitis B*, Vol. http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisB_whocdscsrlyo2002_2.pdf.
- WHO (2004) Comité consultatif mondial sur la sécurité des vaccins de l'Organisation mondiale de la Santé: réponse à l'article de Hernán et al. intitulé "Vaccin Hépatite B recombinant et risque de sclérose en plaques" et publié le 14 septembre 2004 dans la revue Neurology.
- WHO (2008) Hépatite B. *Aide mémoire Mise à jour en 2008* **204**
- Will H, Reiser W, Weimer T, Pfaff E, Buscher M, Sprengel R, Cattaneo R, Schaller H (1987) Replication strategy of human hepatitis B virus. *J Virol* **61**(3): 904-911
- Wilson IA, Skehel JJ, Wiley DC (1981) Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature* **289**(5796): 366-373
- Wingfield PT, Stahl SJ, Williams RW, Steven AC (1995) Hepatitis core antigen produced in *Escherichia coli*: subunit composition, conformational analysis, and in vitro capsid assembly. *Biochemistry* **34**(15): 4919-4932
- Wollersheim M, Debelka U, Hofschneider PH (1988) A transactivating function encoded in the hepatitis B virus X gene is conserved in the integrated state. *Oncogene* **3**(5): 545-552
- Wunderlich G, Bruss V (1996) Characterization of early hepatitis B virus surface protein oligomers. *Arch Virol* **141**(7): 1191-1205
- Wu HL, Chen PJ, Tu SJ, Lin MH, Lai MY, Chen DS (1991) Characterization and genetic analysis of alternatively spliced transcripts of hepatitis B virus in infected human liver tissues and transfected HepG2 cells. *J Virol* **65**(4): 1680-1686
- Wu TT, Coates L, Aldrich CE, Summers J, Mason WS (1990) In hepatocytes infected with duck hepatitis B virus, the template for viral RNA synthesis is amplified by an intracellular pathway. *Virology* **175**(1): 255-261
- Wynne SA, Crowther RA, Leslie AG (1999) The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. *Mol Cell* **3**(6): 771-780
- Xu Z, Bruss V, Yen TS (1997a) Formation of intracellular particles by hepatitis B virus large surface protein. *J Virol* **71**(7): 5487-5494
- Xu Z, Jensen G, Yen TS (1997b) Activation of hepatitis B virus S promoter by the viral large surface protein via induction of stress in the endoplasmic reticulum. *J Virol* **71**(10): 7387-7392

- Yaginuma K, Shirakata Y, Kobayashi M, Koike K (1987) Hepatitis B virus (HBV) particles are produced in a cell culture system by transient expression of transfected HBV DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(9): 2678-2682
- Yamaguchi M, Sugahara K, Shiosaki K, Mizokami H, Takeo K (1998) Fine structure of hepatitis B virus surface antigen produced by recombinant yeast: comparison with HBsAg of human origin. *FEMS Microbiol Lett* **165**(2): 363-367
- Yamamura K, Araki K, Hino O, Tomita N, Miyazaki J, Matsubara K (1990) HBV production in transgenic mice. *Gastroenterol Jpn* **25 Suppl 2**: 49-52
- Yang HI, Lu SN, Liaw YF, You SL, Sun CA, Wang LY, Hsiao CK, Chen PJ, Chen DS, Chen CJ (2002) Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* **347**(3): 168-174
- Yang W, Guo J, Ying Z, Hua S, Dong W, Chen H (1994) Capsid assembly and involved function analysis of twelve core protein mutants of duck hepatitis B virus. *J Virol* **68**(1): 338-345
- Yee JK (1989) A liver-specific enhancer in the core promoter region of human hepatitis B virus. *Science* **246**(4930): 658-661
- Yeh CT, Liaw YF, Ou JH (1990) The arginine-rich domain of hepatitis B virus precore and core proteins contains a signal for nuclear transport. *J Virol* **64**(12): 6141-6147
- Yeh CT, Ou JH (1991) Phosphorylation of hepatitis B virus precore and core proteins. *J Virol* **65**(5): 2327-2331
- Ying C, Van Pelt JF, Van Lommel A, Van Ranst M, Leyssen P, De Clercq E, Neyts J (2002) Sulphated and sulphonated polymers inhibit the initial interaction of hepatitis B virus with hepatocytes. *Antivir Chem Chemother* **13**(3): 157-164
- Yoshimori T, Yamamoto A, Moriyama Y, Futai M, Tashiro Y (1991) Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J Biol Chem* **266**(26): 17707-17712
- Yu M, Summers J (1991) A domain of the hepadnavirus capsid protein is specifically required for DNA maturation and virus assembly. *J Virol* **65**(5): 2511-2517
- Yu M, Summers J (1994) Phosphorylation of the duck hepatitis B virus capsid protein associated with conformational changes in the C terminus. *J Virol* **68**(5): 2965-2969
- Yuen MF, Sablon E, Yuan HJ, Wong DK, Hui CK, Wong BC, Chan AO, Lai CL (2003) Significance of hepatitis B genotype in acute exacerbation, HBeAg seroconversion, cirrhosis-related complications, and hepatocellular carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md)* **37**(3): 562-567
- Yuh CH, Ting LP (1990) The genome of hepatitis B virus contains a second enhancer: cooperation of two elements within this enhancer is required for its function. *J Virol* **64**(9): 4281-4287
- Zahn A, Allain JP (2005) Hepatitis C virus and hepatitis B virus bind to heparin: purification of largely IgG-free virions from infected plasma by heparin chromatography. *The Journal of general virology* **86**(Pt 3): 677-685
- Zhang X, Zhang H, Ye L (2006) Effects of hepatitis B virus X protein on the development of liver cancer. *J Lab Clin Med* **147**(2): 58-66
- Zheng YW, Riegler J, Wu J, Yen TS (1994) Novel short transcripts of hepatitis B virus X gene derived from intragenic promoter. *J Biol Chem* **269**(36): 22593-22598
- Zhou DX, Yen TS (1990) Differential regulation of the hepatitis B virus surface gene promoters by a second viral enhancer. *J Biol Chem* **265**(34): 20731-20734
- Zhou S, Yang SQ, Standring DN (1992) Characterization of hepatitis B virus capsid particle assembly in *Xenopus* oocytes. *J Virol* **66**(5): 3086-3092
- Zhu Y, Yamamoto T, Cullen J, Saputelli J, Aldrich CE, Miller DS, Litwin S, Furman PA, Jilbert AR, Mason WS (2001) Kinetics of hepadnavirus loss from the liver during inhibition of viral DNA synthesis. *J Virol* **75**(1): 311-322

Zlotnick A, Cheng N, Stahl SJ, Conway JF, Steven AC, Wingfield PT (1997) Localization of the C terminus of the assembly domain of hepatitis B virus capsid protein: implications for morphogenesis and organization of encapsidated RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(18): 9556-9561

Zlotnick A, Palmer I, Kaufman JD, Stahl SJ, Steven AC, Wingfield PT (1999) Separation and crystallization of T = 3 and T = 4 icosahedral complexes of the hepatitis B virus core protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55**(Pt 3): 717-720

VU :

Le Directeur de Thèse
(Nom et Prénom)

VU :

Le Responsable de l'Ecole Doctorale

VU pour autorisation de soutenance

Rennes, le

Le Président de l'Université de Rennes 1

Guy CATHELINÉAU

VU après soutenance pour autorisation de publication :

Le Président du Jury,
(Nom et Prénom)

RESUMES

Le virus de l'hépatite B (VHB) est un agent pathogène humain, très contagieux, responsable de pathologies hépatiques telles que la cirrhose ou le carcinome hépatocellulaire. A l'heure actuelle, on estime que 2 milliards de personnes ont été infectées par ce virus dans le monde, parmi lesquelles on recense 350 millions de porteurs chroniques. Malgré l'existence d'un vaccin efficace, le nombre de personnes atteintes par la maladie reste élevé. Pour ces dernières, des traitements puissants existent consistant en l'utilisation d'interférons, efficaces dans 30 à 40% des cas, ou d'antiviraux dont l'inconvénient majeur est la sélection de virus résistants au traitement. Le mécanisme d'entrée du VHB dans les hépatocytes est encore inconnu. Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse a été d'étudier ce mécanisme afin, notamment, de contribuer au développement de nouvelles thérapeutiques empêchant l'entrée virale. Une des approches utilisées pour étudier le processus d'entrée d'un virus consiste à étudier l'implication de ses protéines de surface dans ce phénomène. Ainsi, nous avons recherché la présence de motifs indispensables au processus d'infection dans ces protéines. Pour cela, nous y avons introduit des mutations puis nous avons analysé leur impact sur la capacité des virus à infecter des cellules saines. Cette stratégie nous a permis d'identifier, au sein de la grande protéine de surface du VHB, un nouveau déterminant de l'infectivité possiblement impliqué dans un processus de fusion permettant à l'enveloppe lipoprotéique virale de fusionner avec une membrane cellulaire afin qu'elle libère sa nucléocapside, contenant l'ADN viral, dans le cytoplasme de la cellule infectée.

The hepatitis B virus is an extremely contagious human pathogen responsible for severe hepatic diseases like cirrhosis or hepatocellular carcinoma. Even though infection can be prevented by immunization with an efficient vaccine, about 2 billion people have been infected worldwide, resulting in 350 million chronic carriers that are prone to develop liver diseases. Current treatments consist either in the use of interferon, which modulates antiviral defenses and controls infection in 30 to 40% of cases, or in the use of viral polymerase inhibitors that allow a stronger response to treatment but require long-term utilization and frequently lead to the outcome of resistant viruses. A better understanding of the virus life cycle, and particularly of the mechanism by which the virus enters the cell, could provide background for therapeutics that inhibit the early steps of infection. Then, the objective of my PhD work was to study the mechanism of HBV entry. One approach to decipher viral entry is to interfere with the function of envelope proteins. Therefore, we introduced mutations in HBV surface proteins to identify new motives necessary for viral infectivity. This strategy highlighted the role of a new infectivity determinant, in the HBV large envelope protein, which is probably implicated in a fusion process allowing the release of nucleocapsids into the cytosol of infected cells.