



HAL
open science

Protéine HBx du virus de l'hépatite B : impacts sur la polyploïdisation hépatique au cours du développement et de la maladie du foie

James Ahodantin

► **To cite this version:**

James Ahodantin. Protéine HBx du virus de l'hépatite B : impacts sur la polyploïdisation hépatique au cours du développement et de la maladie du foie. Virologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066373 . tel-01811690

HAL Id: tel-01811690

<https://theses.hal.science/tel-01811690>

Submitted on 10 Jun 2018

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.

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale 515 « Complexité du Vivant »

Inserm U1135 CIMI-Paris / Equipe de recherche « Persistent Viral Infections »

Protéine HBx du Virus de l'Hépatite B : Impacts sur la Polyploïdisation Hépatique au Cours du Développement et de la Maladie du Foie

Par **James AHODANTIN**

Thèse de doctorat de Virologie

Dirigée par Dr Dina KREMSDORF

Présentée et soutenue publiquement le 08 décembre 2017

Devant un jury composé de :

Pr Emmanuèle MOUCHEL-VIELH

Dr Sophie LOTERSZTAJN

Dr David DURANTEL

Pr Joëlle SOBCZAK-THEPOT

Dr Christine NEUVEUT

Pr Cyrille FERAY

Dr Dina KREMSDORF

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

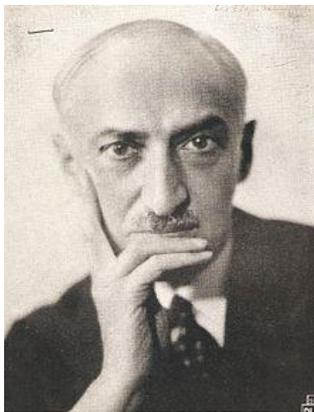
Directeur de thèse

Citations



Albert Camus

*« En vérité, le chemin importe peu, la volonté
d'arriver suffit à tout »*



André Maurois

*« La science ?
Après tout, qu'est-elle, sinon une longue et
systématique curiosité ? »*



REMERCIEMENTS



Mesdames et messieurs les membres du jury, je tiens à vous adresser ma profonde gratitude pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je tiens à remercier particulièrement le professeur Emmanuèle Mouchel-Vielh d'avoir accepté de présider ce jury de thèse. Je remercie très sincèrement le Dr Sophie Lotersztajn et le Dr David Durantel pour l'intérêt porté à mon travail en acceptant d'être les rapporteurs de ma thèse. Je remercie également le professeur Joëlle Sobczak-Thépot, le Dr Christine Neuveut et le professeur Cyrille Feray d'avoir accepté d'être examinateur de ce travail.

Ce travail n'aurait pas été possible sans la confiance que m'a accordé le Dr Dina Kremsdorf, ma directrice de thèse. Je tiens ainsi à t'adresser Dina, ma profonde reconnaissance pour cette opportunité. Je te remercie pour ta disponibilité et ton écoute durant ces cinq années et demi au cours desquelles, j'ai appris t'en sur le plan scientifique que sur la culture générale avec tes grilles de mots fléchés à résoudre tous les midis au déjeuner. Bien que nos échanges scientifiques tournent quelques fois en un grand débat d'idées et de visions différentes, tu ne m'as jamais imposé ton point de vue. Au contraire, tu as toujours tenu compte de mes positions. Plus encore, nous parvenions toujours à un consensus et à répondre ensemble à nos interrogations scientifiques ; merci donc pour cela. Merci encore pour m'avoir non seulement confié ce projet de recherche mais surtout pour m'avoir laissé m'exprimer scientifiquement ; cette liberté me manquera beaucoup. Et bien que mes rapports aient été quelques fois conflictuels avec certains de mes collègues, tu as toujours su garder ton étoffe de chef contrairement à d'autre. Apprendre à tes côtés, a été un honneur et m'a fait grandir. Cette expérience restera gravée en moi à jamais. Mille fois MERCI Dina.

Je tiens également à remercier mes prédécesseurs, Eric Giang et Ivan Quétier pour m'avoir initié respectivement à la transplantation des souris uPA avec des hépatocytes primaires humains, à l'isolement des hépatocytes primaires murins et à l'hépatectomie partielle chez la souris. Je remercie également le Dr Hélène Strick-Marchand pour ses conseils techniques, scientifiques concernant les souris humanisées et cette collaboration scientifique fructueuse.

J'adresse mes sincères remerciements également au Dr Chantal Desdouets pour sa disponibilité et son avis d'experte dans l'étude de la ploïdie hépatique. Merci de m'avoir permis d'utiliser les outils développés par votre équipe. Je remercie aussi le Dr Myriam Bou Nader, la postdoc de Chantal, pour m'avoir initié à l'analyse de la macro ploïdie nucléaire et pour avoir toujours été disponible. Merci à vous pour cette collaboration enrichissante.

Merci aux membres de mon équipe, le Dr Patrick Soussan, le Dr Aurélie Schnuriger, le Dr Tarik Attout et Bouchra Lekbaby. Bien que nous n'ayons pas toujours eu la même vision du monde pour certains d'entre vous, je vous souhaite une aventure scientifique fructueuse en particulier à toi Tarik qui vient d'intégrer l'équipe. Que ce postdoc te soit pleinement favorable et satisfaisant !!! Et à toi, Aurélie, je te souhaite de trouver ta place au sein de l'équipe et de faire d'excellentes publications.

Je ne peux oublier ces gens formidables qui m'ont aidé au cours de cette aventure. Je remercie Sophie Bérissi, Noémie Gadessaud, Sara Fontoura et Laura Charles-Vaton de la plateforme d'histologie de Broussais pour toutes les inclusions/colorations, les milliers lames blanches et le nombre incalculable de lames scannées. Je tiens à remercier également, Corinne Cordier et Jérôme Mégret de la plateforme de cytométrie en flux de Broussais pour leur disponibilité et l'aide technique apportée au FACs pour l'analyse du cycle cellulaire et de la ploïdie hépatique.

Bien que l'arrivée en 2015, de notre équipe dans cette nouvelle unité, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, ait été un changement générateur d'un stress important pour toute l'équipe, plusieurs personnes de cette unité nous ont apporté leur aide et amitié afin de faciliter notre intégration. Pour cela, je remercie les membres des équipes d'Olivier Sylvie et de Dominique Mazier, et le service administratif (Maryse Gérard, Pascale Saurel, Djamilia Chettab et Saddi Saïbi) pour nous avoir mis à l'aise dès notre arrivée. L'interaction avec les autres équipes m'a également permis de rencontrer et d'échanger avec des individus sympathiques ; merci pour cette possibilité. Merci à Jodie Lopez, Floriane Louboutin, Eléna Gonçalves et Andrew Hutton pour votre amitié et cette virée à Amsterdam.

Enfin, comme vous le savez sans doute, le doctorat est un chemin souvent semé d'embûches, de stress, d'épuisements physique et psychologique. J'ai eu la chance de pouvoir compter sur mes proches, les jours où j'avais eu envie de tout abandonner. Pour cela, j'adresse à ma famille, ma profonde reconnaissance pour le soutien financier et moral. Je remercie mes parents Josseline et François pour leur soutien inconditionnel et surtout pour m'avoir toujours laissé faire mes propres choix.

Même si, ces mots ont été écrits le cœur rempli d'émotions et de larmes de joie, je suis très fier de mon parcours et du travail accompli. Merci à tous ceux ou celles qui y ont contribué de près ou de loin. Et je reste persuadé que ce n'est que le début d'une vie professionnelle fructueuse.

Merci à toutes et à tous...



PREAMBULE



Le travail de recherche qui m'a été confié a porté sur une meilleure caractérisation des effets biologiques de la protéine FL-HBx (forme complète) du virus de l'hépatite B (VHB), au cours d'une prolifération physiologique du foie et lors d'une atteinte hépatique. Au cours de ces 3 années d'exploration scientifique, j'ai choisi de me concentrer sur la polyploïdisation des hépatocytes qu'est un événement participant au développement du foie et dont l'altération a été décrite comme associée à de l'instabilité génétique et à la tumorigénèse. L'expertise du Dr Chantal Desdouets a été sollicitée pour l'étude de la polyploïdisation hépatique.

Afin de faciliter la lecture de mon manuscrit de thèse, j'ai choisi de traiter dans mon introduction, 4 grandes parties relativement exhaustives. La 1^{ère} partie a été consacrée à mon organe d'étude, le « Foie ». J'y fais une présentation généraliste de l'organogenèse de cet organe fascinant et quelques pathologies majeures le concernant. Dans la 2^{ème} partie, je présente des données actualisées sur le VHB qui est un virus qui infecte principalement le foie et est responsable de plus de 50% des hépatopathies. J'effectue ensuite dans la 3^{ème} partie, quelques rappels sur le cycle de division cellulaire et sa régulation afin de faciliter la compréhension de la dernière partie de mon introduction. Enfin, dans la 4^{ème} partie de mon introduction, j'aborde la notion de polyploïdie de façon globale et ensuite dans le foie.

Ce manuscrit se compose donc d'une introduction traitée en 4 parties, suivie de l'objectif du travail de recherche, des résultats obtenus subdivisés en résultat A (papier soumis à *Journal of Hepatology*) et résultat B (papier en préparation), d'une discussion des données obtenues, d'une annexe comportant 2 publications en lien direct avec mon projet de recherche et dont je suis co-auteur puis des références bibliographiques.

L'équipe « Persistent Viral Infection » actuellement au Centre d'Immunologie et des Maladies infectieuses à Paris dans l'unité Inserm U1135 créée en 2014, est composée de 3 groupes dont celui dirigé par ma directrice de thèse Dina Kremsdorf, groupe « Virus de l'hépatite B et physiopathologie ».

J'ai en effet, intégré l'équipe de Dina Kremsdorf en 2012, à l'institut Necker dans l'unité Inserm U845, en tant qu'ingénieur d'étude sur un projet en collaboration avec Hélène Strick-marchand de l'équipe de James Di Santo. Ce projet de recherche a eu pour but, le développement d'un modèle de souris présentant un foie et un système immunitaire humains pour l'étude du VHB. J'ai effectué ce projet de 2012 à 2014 puis en parallèle avec mon projet de thèse, de 2014 à 2017. Ce travail sur les souris humanisées a été l'objet de 2 publications dont je suis co-signataire dans les journaux *Plos One* (2015) et *Gastroenterology* (2017). A mon arrivée dans

l'équipe, j'ai également participé à la finalisation de 2 projets *in vivo* portant sur le rôle des 2 formes de la protéine HBx (FL-HBx ; Ct-HBx, forme tronquée) dans la régénération et la carcinogenèse hépatique. Ces études ont également été l'objet de 2 publications dont je suis co-auteur, dans les journaux *Journal of Hepatology* (2013) et *Journal of General Virology* (2015). J'ai participé aussi aux travaux du Dr Patrick Soussan sur la protéine HBSP (« Hepatitis B Spliced Protein ») qui ont fait l'objet de 2 publications récentes dont je suis co-auteur dans les journaux *Faseb Journal* (2015) et *Journal of Hepatology* (2017). J'ai en revanche choisi de mettre uniquement en annexe de mon manuscrit, les 2 publications sur la protéine HBx.

Publications et travaux en cours :

- 1 › **Ahodantin J**, Soussan P, Desdouets C, Kremsdorf D › *Hepatitis B virus X protein : impacts on polyploidy during liver fibrosis*. **2017** (En préparation).
- 2 › **Ahodantin J**, Bou-Nader M, Cordier C, Mégret J, Soussan P, Desdouets C, Kremsdorf D › *Hepatitis B virus X protein mediates aberrant polyploidization in the liver and enhances hepatocellular carcinoma initiation*. **2017** (soumis à **Journal of Hepatology**).
- 3› Dusséaux M, Masse-Ranson G, Darche S, **Ahodantin J**, Li Y, Fiquet O, Beaumont E, Moreau P, Rivière L, Neuveut C, Soussan P, Roingard P, Kremsdorf D, Di Santo JP, Strick-Marchand H › *Viral load affects the immune response to HBV in mice with humanized immune system and liver*. **Gastroenterology** **2017** (sous presse).
- 4› Duriez M, Mandouri Y, Lekbaby B, Wang H, Schnuriger A, Redelsperger F, Guerrera CI, Lefevre M, Fauveau V, **Ahodantin J**, Quetier I, Chhuon C, Gourari S, Boissonnas A, Gill U, Kennedy P, Debzi N, Sitterlin D, Maini MK, Kremsdorf D, Soussan P › *Alternative splicing of hepatitis B virus: A novel virus/host interaction altering liver immunity*. **Journal of Hepatology** **2017** ; 67(4):687-699.
- 5› Strick-Marchand H, Dusseaux M, Darche S, Huntington ND, Legrand N, Masse-Ranson G, Corcuff E, **Ahodantin J**, Weijer K, Spits H, Kremsdorf D, Di Santo JP › *A novel mouse model for stable engraftment of a human immune system and human hepatocytes*. **PLoS One** **2015**; 10:e0119820.
- 6› Quetier I, Brezillon N, Revaud J, **Ahodantin J**, DaSilva L, Soussan P, Kremsdorf D › *C-terminal-truncated hepatitis B virus X protein enhances the development of diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinogenesis*. **Journal of General Virology** **2015**; 96:614-25.
- 7› Pol JG, Lekbaby B, Redelsperger F, Klamer S, Mandouri Y, **Ahodantin J**, Bieche I, Lefevre M, Souque P, Charneau P, Gadessaud N, Kremsdorf D, Soussan P › *Alternative splicing-regulated protein of hepatitis B virus hacks the TNF-alpha-stimulated signaling pathways and limits the extent of liver inflammation*. **Faseb Journal** **2015** ; 29:1879-89.
- 8› Quetier I, Brezillon N, Duriez M, Massinet H, Giang E, **Ahodantin J**, Lamant C, Brunelle MN, Soussan P, Kremsdorf D › *Hepatitis B virus HBx protein impairs liver regeneration through enhanced expression of IL-6 in transgenic mice*. **Journal of Hepatology** **2013** ; 59:285-91.



LISTE DES ABREVIATIONS



2-AAF : 2-acetyl-aminofluorene
ACAT : Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase
ADH : Alcohol dehydrogenases
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNccc : ADN circulaire covalamment clos
ADNrc : ADN circulaire relâché
ADV : Adéfovir
AFB1 : Aflatoxine B1
AFP : Alpha-fétoprotéine
AG : Acides gras
AgHBc : Antigène de capsid de l'hépatite B
AgHBe : Antigène de « e » de l'hépatite B
AgHBs : Antigène de surface de l'hépatite B
AIP1 : Actin-interacting protein 1
ALDH : Aldehyde dehydrogenase
Alpha-SMA : Alpha-Smooth Muscle Actin
ALT : Alanine aminotransferase
AP1 : Activator protein 1
AP-2 : Activator protein 2
APC : Adenomatous polyposis coli
APC/c : Anaphase-promoting complex
ARID1A : AT-rich interactive domain-containing protein 1A
ARN : Acide ribonucléique
ARNpg : ARN pré-génomique
ASBT : Apical sodium dependent-bile acid transporter
AST : Aspartate aminotransferase
ATF : Activating transcription factor 1
ATG7 : Autophagy-related protein 7
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP : Adénosine triphosphate
ATR : ATM- and Rad3-related
BAD : BCL-2 associated death promoter

BAMBI : Bone morphogenetic protein and activin membrane bound inhibitor
BCL-2 : B-cell lymphoma 2
BDL : Bile duct ligation
BMP : Bone morphogenetic protein
BrdU : Bromodeoxyuridine
C/EBP : CCAAT/enhancer-binding proteins
CCL4 : Carbon tetrachloride
CDC : Centers for Disease Control and Prevention
Cdc6 : Cell division cycle 6
CDK : Cyclin-Dependent Kinases
Cdt1 : Chromatin licensing and DNA replication factor 1
CHB : Chronic Hepatitis B
CHC : Carcinome hépatocellulaire
ChIP : Chromatin immunoprecipitation
Chk1 : Checkpoint Kinase 1
Chk2 : Checkpoint Kinase 2
CIN : Chromosome instability
CKIs : Cdk Inhibitors
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CMLV : Cellule musculaire lisse vasculaire
Colla1 : Collagène 1a1
Cox-2 : Cyclo-oxygénase 2
CPA : Cellule présentatrice d'antigène
CPN : Complexe du pore nucléaire
CREB : cAMP response element binding protein
Crm1 : Chromosomal Maintenance 1
CRP : C-reactive protein
CTGF : Connective tissue growth factor
Ct-HBx : C-terminal truncated HBx
CTL : Cytotoxic T lymphocytes
CTNNB1 : Bêta-caténine
CYP2E1 : Cytochrome 2E1

DAA : Direct Acting Antivirals
DDB1 : DNA damage binding protein 1
DEN : Diethyl nitrosamine
DHBV : Duck Hepatitis B Virus
DNMT1 : DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1
DR1 : Direct repeat 1
DUSP1 : Dual specificity protein phosphatase 1
EASL : European Association for the Study of the Liver
EBV : Epstein-Barr Virus
ECT2 : Epithelial cell transforming 2
EGF : Epithelial growth factor
EGFR : Epithelial growth factor receptor
EGR-1 : Early growth response protein 1
EMT : Epithelial–mesenchymal transition
EpCam : Epithelial cell adhesion molecule
ERCC1 : Excision Repair Cross-Complementation Group 1
ERK : Extracellular signal-regulated kinases
ESCRT : Endosomal sorting complexes required for transport
ETV : Entecavir
FAK : Focal adhesion kinase
FDA : Food and drug administration
FGF : Fibroblast growth factor
FL-HBx : Full-length HBx
Foxf1 : Forkhead box protein F1
FoxM1 : Forkhead box protein M1
FXR : Farnesoid X receptor
Gadd45- α : Growth Arrest and DNA Damage 45 alpha
GATA4 : GATA binding protein 4
GFAP : Glial fibrillary acidic protein
GLUL : Glutamate-ammonia ligase
GM-CSF : Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GpC3 : Glypican 3

GRP78 : 78 kDa Glucose-regulated protein
GS : Glutamine synthetase
GSK3- β : Glycogen synthase kinase-3 beta
HBSP : Hepatitis B spliced protein
HBXIP : Hepatitis B X-interacting protein
HDAC1 : Histone deacetylase 1
Hdj1 : DnaJ homolog subfamily B member 1
HDL : High-density lipoprotein
HFD : High fat diet
HIF1 : Hypoxia inducible factor 1
HNF1- α : Hepatocyte nuclear factor 1-alpha
hnRNPA1 : Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
HPV : Human papilloma virus
HSC : Hepatic stellate cells
Hsp : Heat shock proteins
IFN : Interferon
IHC : Immunohistochemistry
IL-6 : Interleukine 6
INCENP : Inner centromere protein
IPS-1 : Interferon-beta promoter stimulator 1
IRE1- α : Inositol-requiring enzyme 1
ISGs : Interferon-Stimulated Genes
JNK : c-Jun N-terminal kinase
KC : Kupffer cell
Keap1 : Kelch-like ECH-associated protein 1
KIR : Killer-cell immunoglobulin-like receptor
KO : Knock out
LDL : Low-density lipoprotein
LGR5 : Leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5
LINE : Long interspersed nuclear element
LMV : Lamivudine
LPL : Lipoprotéine lipase

LPS : Lipopolysaccharides
LRAT : Lecithin:retinol acyltransferase
LSEC : Liver sinusoidal endothelial cells
Ly6D : Lymphocyte Antigen 6 Family Member D
Mad2 : Mitotic arrest deficient 2
MAPKK : Mitogen-activated protein kinase kinase
MAPKs : Mitogen-activated protein kinase
MCC : Mitotic Checkpoint Complex
MCD : Methionine-choline-deficient diet
MCM : Minichromosome maintenance
MCP1 : Monocyte chemotactic protein 1
M-CSF : Macrophage colony-stimulating factor
MDA-5 : Melanoma differentiation-associated gene 5
Mdm2 : Mouse double minute 2
MEC : Matrice extracellulaire
MECP2 : Methyl-CpG binding protein 2
MEKK1 : Stress-mediated mitogen activated-protein kinase 1
MFs : Myofibroblastes
Mklp1 : Mitotic kinesin-like protein 1
MLL : Lysine-specific methyltransferase
MMP : Metalloproteinase
MPF : Mitosis promoting factor
MRLC : Myosin Regulatory Light Chain
mTOR : Mammalian Target of Rapamycin
MVB : Multi vesicular body
MYPT : Myosin phosphatase targeting protein
NA : Nucleos(t)ique analogue
NADPH : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NAFLD : Non alcoholic fatty liver disease
NASH : Non alcoholic steatohepatitis
NEBD : Nuclear envelope breakdown
Nedd4 : Neural precursor cell-expressed developmentally downregulated gene 4

NEK2 : NIMA related kinase 2
NER : Nucleotide excision repair
NES : Nuclear export signal
NF- κ B : Nuclear factor-kappa B
NK : Natural killer
NKT : Natural killer T
NLS : Nuclear localisation signal
NOX : NADPH oxidase
Nrf2 : Nuclear factor erythroid 2 (NF-E2)-related factor 2
NTCP : Sodium Taurocholate Co-transporting Polypeptide
Nups : Nucleoporines
OMS : Organisation mondiale de la santé
ORC : Origin Recognition Complex
ORF : Open reading frame
PAMP : Pathogen associated molecular patterns
PBMC : Peripheral blood mononuclear cells
PCNA : Proliferating cell nuclear antigen
PD-1 : Programmed cell death 1
PDCD4 : Programmed cell death 4
PDGF : Platelet-derived growth factor
PEG : Polyéthylène glycol
PepCK : Phosphoenolpyruvate carboxykinase
PERK : PKR-like endoplasmic reticulum kinase
PI3K : Phosphatidylinositide 3-kinases
PIK3CA : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase
PIKKs : Phosphatidylinositol 3-kinase-like kinases
PKA : Protein kinase A
PKC : Protein kinase C
PLK1 : Polo-like kinase
PMCA : Plasma membrane calcium ATPase
Pol-K : Polymerase kappa
PPAR- γ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

pRb : protéine du rétinoblastome
PRC1 : Protein regulator of cytokinesis 1
PRMT1 : Protein arginine N-methyltransferase 1
PRR : Pattern recognition receptor
PTEN : Phosphatase and tensin homolog
PXR : Pregane X receptor
PYK2 : Proline-rich tyrosine kinase
RAB5 : Ras-related protein Rab-5
RAR : Retinoic acid receptor
RASSF1A : Ras association domain family member 1
RE : Réticulum endoplasmique
RIG-I : Retinoic acid inducible gene I
RNaseH : Ribonucléase H
RNP : Ribonucléoprotéine
ROS : Reactive oxygen species
RP6SKA3 : Ribosomal protein S6 kinase alpha-3
RXR : Retinoid X receptor
SAC : Spindle Assembly Checkpoint
SERCA1 : Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1
SINE : Short interspersed nuclear elements
SKP2 : S-phase kinase associated protein 2
SREBP1 : Sterol regulatory element binding protein 1
SRPK : Serine (S)/arginine (R) protein-specific kinases
STAT : Signal transducer and activator of transcription
TAF : Ténofovir alafénamide
TBP : TATA binding protein
TDF : Ténofovir
TDP2 : Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2
TERC : Telomerase RNA component
TERT : Telomerase reverse transcriptase
TFII : Transcription factor II
TG : Triglycérides

Tg : Transgénique

TGC : Trophoblast giant cell

TGF- β : Tumor growth factor bêta

TIMP1 : TIMP metallopeptidase inhibitor 1

TLR : Toll-like receptor

TNF- α : Tumor necrosis factor alpha

TP53 : Tumor protein p53

TRIF : TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β

uPA : Urokinase plasminogen activator

UV : Ultraviolet

UVDDDB : Damaged DNA induced UV-damaged DNA-binding protein

VEGF : Vascular endothelial growth factors

VHB : Virus de l'hépatite B

VHC : Virus de l'hépatite C

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

VLDL : Very low-density lipoprotein

Vsp4A : Vacuolar protein sorting 4 homolog A

WHV : Woodchuck hepatitis virus

WHx : Woodchuck X protein

XBP1 : X-box binding protein 1

ZFN : Zinc finger



SOMMAIRE



Sommaire

INTRODUCTION	7
PARTIE 1 : Le Foie	9
I- Organogenèse et anatomie du foie	11
A) Embryogenèse	11
B) Anatomie	11
1- Morphologie externe	11
2- Morphologie interne, segmentation et architecture hépatique	15
3- Composition cellulaire	17
a) Les hépatocytes	17
b) Les cholangiocytes	19
c) Les cellules endothéliales	19
d) Les cellules de Kupffer	19
e) Les cellules stellaires	19
f) Les granulocytes	20
g) Les cellules ovales	20
h) La matrice extracellulaire	20
C) Fonctions hépatiques	21
1- Métabolisme glucidique	21
2- Métabolisme lipidique	22
3- Métabolisme protéique	23
4- Synthèse et sécrétion de la bile	24
5- Détoxification	25
II- Pathophysiologie du foie	26
A) Généralités	26
B) L'hépatite chronique : de la fibrose à la cirrhose hépatique	26
1- Principales étiologies de la fibrose hépatique	28
a) La maladie alcoolique du foie	28
b) Les hépatites virales B et C	28
c) Les hépatopathies stéatosiques dites non-alcooliques	28
2- Mécanismes cellulaires et moléculaires de la fibrose	29
a) Les acteurs de la fibrogenèse	29
b) Régulation métabolique des HSC	32
c) Régulation génique dans la fibrose	35
d) Diagnostic et traitements	37

C)	Vers le carcinome hépatocellulaire	39
1-	Caractéristiques et signalisations moléculaires de la carcinogenèse hépatique	39
a)	Les télomères et la télomérase	41
b)	La voie WNT/ β -caténine	42
c)	La voie p53/cycle cellulaire	43
d)	Le stress oxydatif	43
e)	Les régulateurs épigénétiques	44
f)	Les voies PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MAPK	45
2-	Classification moléculaire du CHC	47
a)	Les CHC prolifératifs	49
b)	Les CHC non prolifératifs	49
PARTIE 2 : Le Virus de l'Hépatite B		51
I-	Origine et découverte	51
A)	Phylogénie	51
1-	Classification	51
2-	Sérotypes et génotypes	53
B)	Tropisme et mode de transmission	55
II-	Biologie moléculaire du VHB	57
A)	Structure et particules sous-virales	57
B)	Le cycle de réplication du VHB et organisation génétique	57
1-	Cycle de réplication du VHB	57
a)	Attachement et entrée	57
b)	Transport et libération du génome	58
c)	Formation et transcription de l'ADNccc	59
d)	Encapsidation et transcription inverse	60
e)	Morphogenèse	61
f)	Epissage alternatif du VHB	61
2-	Organisation génétique	62
a)	Les éléments structuraux	62
b)	Les éléments régulateurs	63
3-	Gènes et protéines virales	65
a)	L'ORF P et la Polymérase	65
b)	L'ORF S et les protéines d'enveloppe	66
c)	L'ORF C, les protéines Core et l'AgHBc	67
d)	L'ORF X et la protéine HBx	69
III-	Biologie de l'infection	70
A)	Epidémiologie	70

B)	Histoire naturelle de l'infection par le VHB	71
C)	Prophylaxie et thérapies existantes	75
1-	La vaccination	75
2-	Les traitements de l'hépatite chronique B	76
a)	L'interféron- α	77
b)	Les analogues nucléos(t)idiques et résistances	78
D)	Les nouvelles approches thérapeutiques (voir Table)	81
1-	Les DAA (« Direct Acting Antivirals »)	81
a)	Analogues nucléos(t)idiques de 2 ^{ème} génération	81
b)	Les inhibiteurs d'entrée	81
c)	Les inhibiteurs d'assemblage de la capsid	82
d)	Les inhibiteurs de l'ADNccc	82
e)	Les inhibiteurs de la sécrétion de l'AgHBs	82
f)	Les ARNs interférents	82
2-	Les « Enhancers » de la réponse immunitaire	83
IV-	Pathogenèse du VHB	84
A)	Rôle de l'immunité dans les infections aiguë et chronique	84
1-	Immunité innée	85
2-	Immunité adaptative	88
a)	Réponse cellulaire	88
b)	Réponse humorale	90
B)	Pathogenèse virale B directe	91
1-	Impact de l'intégration	92
a)	Pour la cellule hôte	93
b)	Pour le virus	95
2-	Impacts de la variabilité génotypique du VHB	96
V-	Protéine HBx et pathogénicité	97
A)	HBx, une protéine à effet pléiotrope	97
B)	HBx, réplication et persistance du VHB	99
C)	HBx et carcinogénèse hépatique	102
1-	Impacts des mutants naturels de la protéine HBx	102
a)	Mutations ponctuelles	102
b)	Mutants délétés en C-terminal	103
2-	HBx et hépatite chronique B	105
a)	Régulation métabolique et maladie chronique	105
b)	HBx et fibrose hépatique	107
3-	Impacts de la protéine HBx dans le développement du CHC	109

a) HBx et méthylation/acétylation	109
b) HBx et ARN non codants	110
c) HBx et instabilité génétique	111
d) HBx et cycle cellulaire	112
e) HBx et progression tumorale	113
PARTIE 3 : Le cycle de division cellulaire et sa régulation	115
I- Le cycle cellulaire	115
A) Les régulateurs clés de la progression du cycle cellulaire : Cyclines et CDKs	116
B) L'interphase	119
1- La phase G0	119
2- La phase G1	121
3- La transition G1/S et la phase S	121
4- La phase G2 et la transition G2/M	123
C) La phase M ou Mitose	124
D) La cytokinèse	125
II- Autres intervenants du cycle	128
A) Le cycle des centrosomes	128
B) Contrôle de l'intégrité génomique	130
PARTIE 4 : La Polyplœdie	133
I- Généralités et définitions	133
II- La polyplœdie chez les eucaryotes	133
A) Polyplœdisation chez les mammifères	136
1- Polyplœdie et Mécanismes	136
a) La fusion cellulaire	137
b) L'endoréplication (transition G2/M)	137
c) Le glissement mitotique « Mitotic slippage » (en métaphase)	141
d) La cytokinèse incomplète	142
2- Les avantages de la polyplœdie	143
a) Polyplœdie et protection génique	143
b) Polyplœdie et réorientation du tissu	143
c) Polyplœdie et senescence cellulaire	144
3- La polyplœdie « Le côté obscur de la force »	144
a) Polyplœdie, aneuploïdie et pathologie	144
b) Les acteurs de la polyplœdie pathologique	147
B) Le foie, un organe polyplœdie	148
1- Polyplœdie et développement postnatal du foie	148

2- Mécanismes de la polyploïdie physiologique du foie	149
3- Polyploïdie dans le foie vieillissant et réversion.....	151
4- Rôle et fonction biologiques de la polyploïdisation du foie	153
5- Polyploïdie pathologique et atteintes hépatiques.....	155
BUT DU TRAVAIL	159
RESULTATS	163
RESULTATS (A)	165
I. Contexte et but de l'étude	169
II. Protéine FL-HBx : impact sur la polyploïdisation physiologique et le métabolisme des hépatocytes.....	170
III. Protéine FL-HBx et polyploïdie : impact sur l'initiation et le développement du CHC .	172
IV. Conclusion.....	173
RESULTATS (B)	175
I. Contexte et rationnel de l'étude	179
II. Impact de la protéine HBx dans la maladie hépatique	181
A) Fibrose et polyploïdie hépatique :.....	181
B) Fibrose et métabolisme hépatique :	183
C) Conclusion.....	185
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	186
ANNEXES	186
ANNEXE 1	186
ANNEXE 2	186
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	186



INTRODUCTION

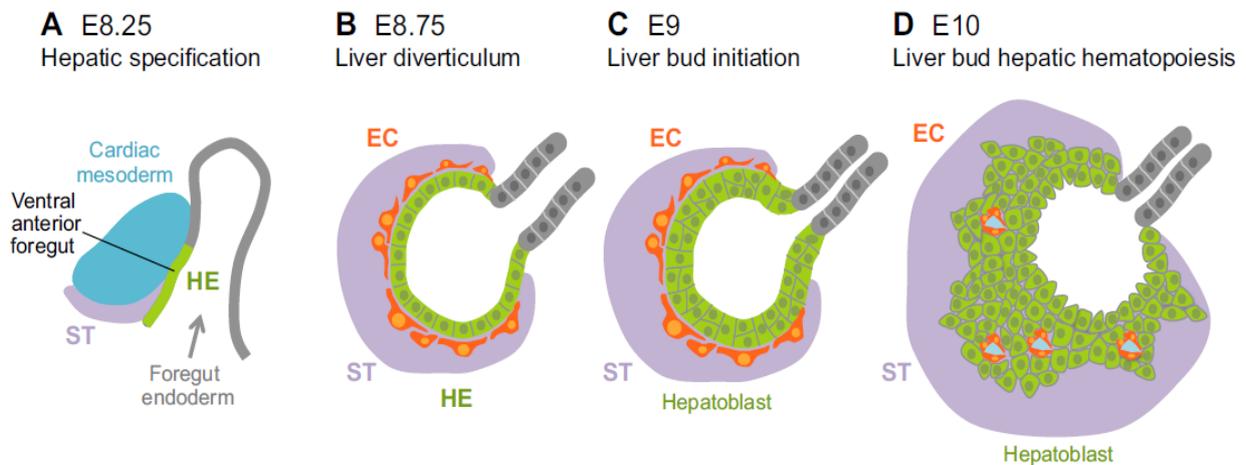


PARTIE 1 : Le Foie

Dénoté « *Hepar* » et considéré comme le siège de la vie dans la Grèce antique, le foie notamment le foie gras, est l'un des mets les plus appréciés tant pour les plaisirs de la table que pour sa richesse en oligo-éléments. Ainsi, le XXe siècle voit la naissance de nombreuses maisons de Foie Gras et les chefs français le mettent en scène sur toutes les grandes tables du monde dans les années 70. Le foie gras reste de nos jours, l'un des mets raffinés les plus prisés en France et dans le monde.

En dehors de son intérêt dans la gastronomie, le foie en tant qu'organe, participe à la mise en réserve et à la distribution des nutriments absorbés par l'intestin. Il joue un rôle crucial dans la biotransformation et l'élimination des déchets endogènes et des xénobiotiques. Il contribue également à la régulation du flux sanguin ainsi qu'à la défense immunitaire.

Doué d'une extraordinaire capacité de régénération, le foie est un organe extrêmement complexe. La première description des capacités régénératives du foie remonte à la mythologie grecque avec le mythe de Prométhée, légende rendue célèbre par les peintures de Titien, Rubens et de Moreau. Dans des conditions physiologiques, le foie est un organe quiescent. Les études de Higgins et Anderson sur le rat en 1931, ont permis d'observer les capacités de régénération incroyables du foie. Ainsi, Il est possible de réaliser plus de 12 hépatectomies successives à un rat en observant une régénération hépatique complète entre chaque procédure (Stocker et al. 1973). La masse initiale du foie serait alors restaurée via un processus d'hyperplasie respectant l'architecture microscopique habituelle suivit d'une phase d'hypertrophie marquée par un phénomène de polyploïdisation des hépatocytes (Sigal et al. 1999).



Adapté de la revue de Miriam Gordillo et al. Development 2015.

Figure 1 : Formation du diverticule et de bourgeons hépatiques chez la souris. (A) Section sagittale de la partie céphalique de l'endoderme hépatique (HE : Hepatic endoderm, vert) de souris E8.25. La convergence du mésoderme cardiaque (bleu) et du septum transversum (ST, violet) est nécessaire pour la spécification hépatique. (B-D) Sections transversales du diverticule hépatique de la souris progressant vers le stade du bourgeon du foie. (B) À E8.75, on trouve des cellules endothéliales (EC : Endothelial cells, orange) entourant l'endoderme hépatique épaissi, qui déclenche un processus de bourgeonnement dans le septum transversum. Les cellules endothéliales contribuent à la spécification hépatique. (C) À E9, l'endoderme hépatique passe d'un épithélium colonnaire à un pseudostratifié. (D) A E10, les cellules d'endoderme hépatique, identifiées comme des hépatoblastes, prolifèrent et migrent vers le septum transversum pour former le bourgeon du foie. Des cellules endothéliales sont également nécessaires pour la formation de bourgeons hépatiques. Les cellules progénitrices hématopoïétiques commencent maintenant à migrer dans le bourgeon pour établir une hématopoïèse foetale foie.

I- Organogenèse et anatomie du foie

A) Embryogenèse

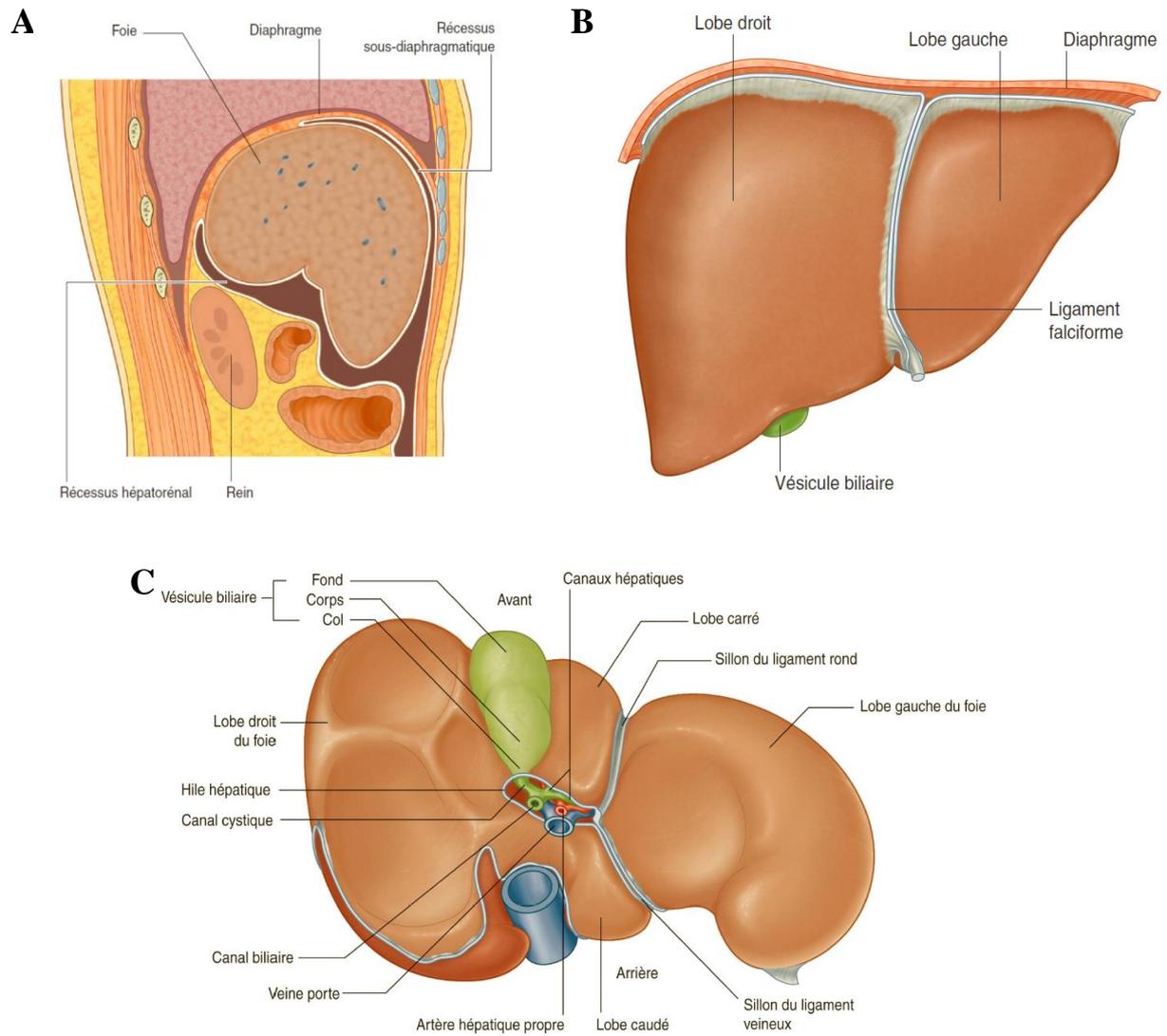
Les deux principaux types de cellules du foie, à savoir les hépatocytes et les cholangiocytes, dérivent d'un bourgeon d'origine endodermique. Chez la souris, le bourgeon hépatique est induit par les facteurs de croissance FGF régulé par les MAPKs et BMP/GATA4 synthétisés respectivement par le mésoderme cardiaque et par le mésoderme du *septum transversum* (Fig. 1). En effet, l'endoderme est issu de la face antérieure primitive de l'embryon après gastrulation et est identifiable six heures après fécondation chez le poisson zèbre, E7.5 jours chez la souris et la troisième semaine de gestation chez l'homme. Les études de cellules souches embryonnaires (CSE) montrent que ces cellules migrent dans la partie antérieure de l'embryon, se séparent du mésoderme pour former ensuite l'endoderme définitif (ED). Chez les mammifères, l'ED est divisé en trois domaines progéniteurs antérieur, moyen et postérieur. La partie antérieure de l'endoderme donne naissance au foie, au pancréas, à l'estomac, aux poumons et à la thyroïde (Tremblay et al. 2005). L'hépatogenèse est régulée par différentes voies de signalisation telles que celles du TGF- β , de WNT, du FGF, de Notch et BMP (« Bone morphogenetic protein ») (Zaret et al. 2008, Si-Tayeb et al. 2010).

Au moment de la naissance, l'architecture du foie est bien établie avec des régions portales reliées aux veines centrales par une bicouche d'hépatocytes. Les hépatocytes sont en contact avec le sang venant de la veine porte par leur face sinusoidale et avec les sécrétions biliaires par leur face canaliculaire basolatérale. La sécrétion de la bile se met en place tôt, aux environs de la douzième semaine de gestation chez l'homme. La production d'AFP (« Alpha-fétoprotéine ») atteint son pic à la fin du troisième trimestre alors que celle de l'albumine commence vers la seizième semaine de grossesse et atteint à la naissance, le niveau trouvé chez l'adulte (Beath 2003).

B) Anatomie

1- Morphologie externe

Le Foie est l'organe le plus volumineux de l'organisme humain est recouvert en grande partie de péritoine et d'une capsule fibreuse. Le foie pèse environ 2 % du poids corporel (1,5 kg en moyenne) avec une consistance ferme et discrètement élastique. Il est situé dans la partie



Tiré de Gray's Anatomie pour les étudiants, Richard L. Drake (traduit de Drake, Vogl, Mitchell, Gray's Anatomy for Students, 2nd ed, 978044306952). Elsevier Masson, 2e édition, 2011.

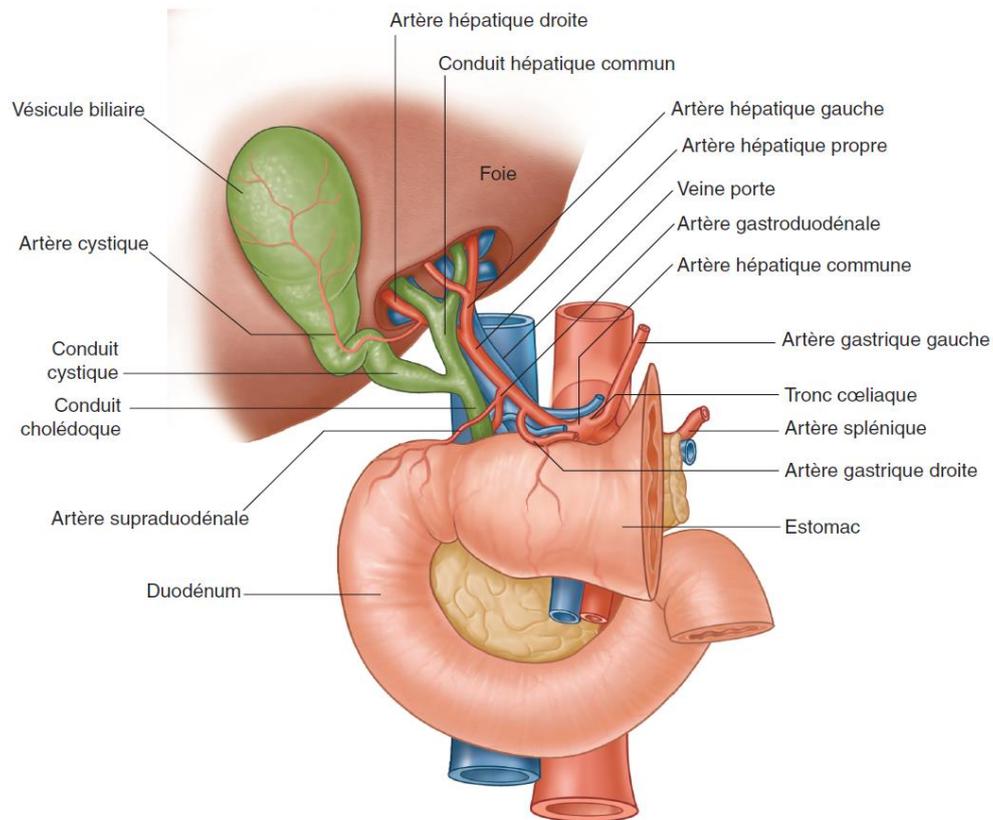
Figure 2 : Anatomie et Morphologie externe du foie. (A) Faces du foie et récessus associés au foie. (B) Face diaphragmatique du foie. (C) Faces viscérales du foie.

supérieure droite de l'abdomen, sous la coupole diaphragmatique droite et une partie de la gauche. Partiellement protégé par les côtes, le foie est séparé des poumons et du cœur par le diaphragme. Il est localisé à droite de l'estomac, au-dessus du duodénum et de l'angle colique droit (Fig. 2A). On décrit trois faces (diaphragmatique, viscérale dorsale, viscérale caudale) (Fig. 2B et 2C) :

- La face diaphragmatique est divisée par l'insertion du ligament falciforme. Elle épouse la forme du diaphragme et est lisse, convexe (le dôme).
- La face viscérale présente une partie antérieure dite caudale et une partie postérieure dite dorsale (Fig. 2C) : i) La face viscérale caudale est irrégulière et marquée par : les sillons gauche, droit et transverse. On définit le lobe gauche en dedans du sillon gauche, le lobe droit en dehors du sillon droit et entre ces deux sillons le lobe carré en avant du sillon transverse et le lobe caudé en arrière ; ii) La face viscérale dorsale est verticale, marquée latéralement par un sillon vertical large et le sillon du ligament veineux. Ces deux sillons délimitent le lobe caudé ou lobe de Spiegel.

Extérieurement, on décrit deux lobes principaux, le lobe droit (environ 75 % du volume) et le lobe gauche (environ 25 % du volume), délimités par l'insertion du ligament rond et du ligament falciforme, le sillon gauche et le sillon du ligament veineux. Sur la face viscérale caudale, le lobe carré se trouve entre le hile, la fissure ombilicale et la fosse vésiculaire, et le lobe caudé entre le hile et le sillon du ligament veineux. Le foie est fixé d'une part au diaphragme et à la paroi postérieure de l'abdomen par le ligament coronaire et d'autre part, à la veine cave inférieure par son adventice et les veines hépatiques. L'innervation du foie est assurée par les fibres nerveuses sympathiques et parasympathiques. Les nerfs du foie sont issus du plexus nerveux hépatique, le plus grand plexus dérivé du plexus coéliqua. Pour atteindre le foie, le plexus hépatique accompagne les branches de l'artère hépatique et de la veine porte. À part la vasoconstriction, leur fonction reste mal connue.

Le foie a deux pédicules vasculaires (Fig. 3) : i) Le pédicule inférieur afférent (pédicule hépatique) est particulier par sa double vascularisation, artérielle (artère hépatique propre se divisant en artères hépatiques droite et gauche) et veineuse (veine porte). Les artères hépatiques et la veine porte pénètrent dans le foie par le hile, veine porte en arrière, artères hépatiques en avant et à gauche. Le débit sanguin hépatique est de l'ordre de 1,5 litre par minute. La veine porte assure 70 à 80 % du débit sanguin hépatique et apporte du sang provenant de la totalité du tube digestif sous-diaphragmatique, du pancréas et de la rate. Les artères hépatiques



Tiré de Gray's Anatomie pour les étudiants, Richard L. Drake (traduit de Drake, Vogl, Mitchell, Gray's Anatomy for Students, 2nd ed, 978044306952). Elsevier Masson, 2e édition, 2011.

Figure 3 : Vascularisation afférente du foie

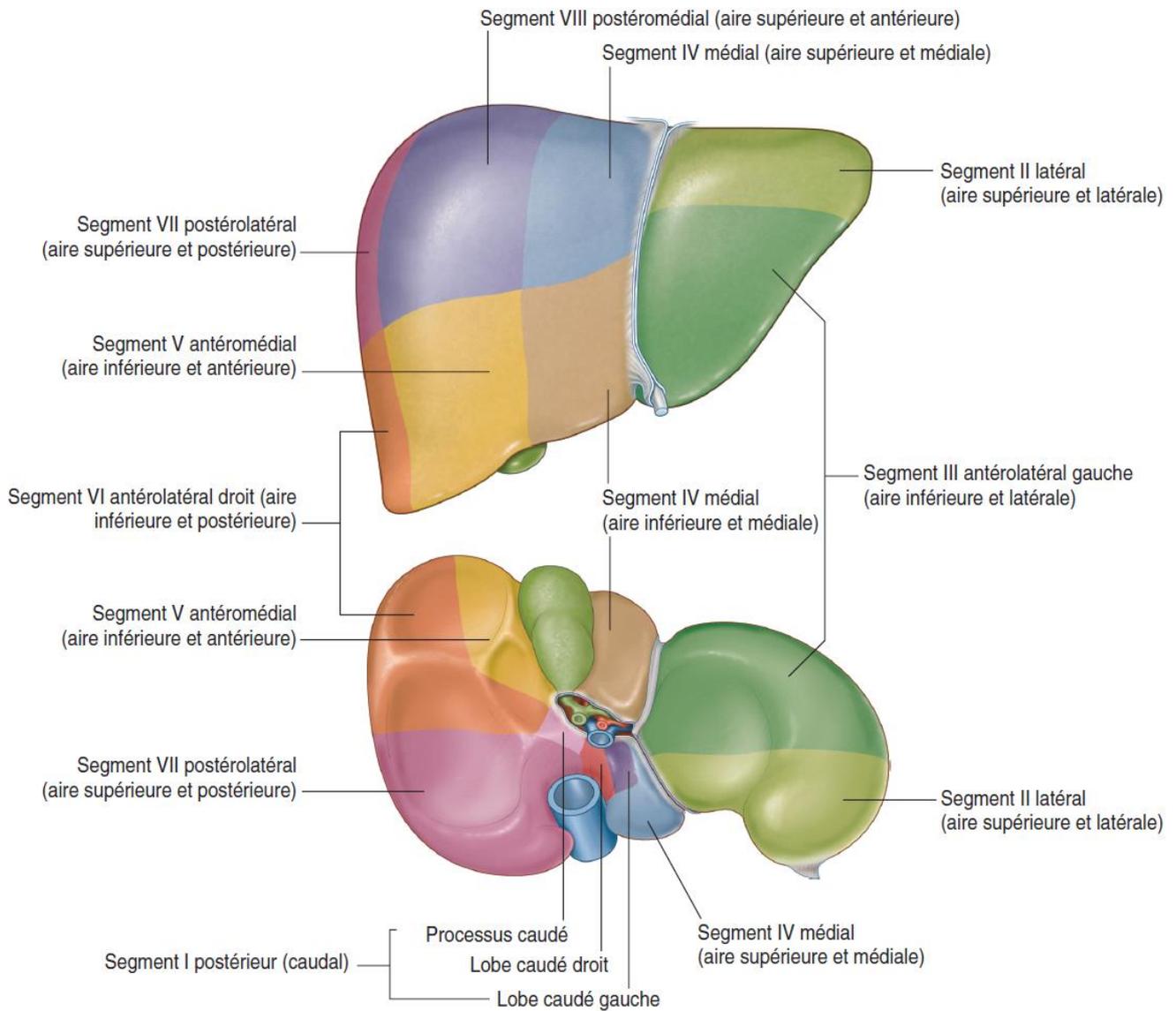
apportent un sang oxygéné représentant 20 à 30 % du débit total et assurent la vascularisation exclusive des voies biliaires. Les lymphonœuds du foie sont situés sur les deux faces du pédicule inférieur afférent ; ii) Le pédicule supérieur efférent veineux est constitué par les trois veines hépatiques principales (veines sous-hépatiques) : gauche, moyenne et droite qui se jettent dans la veine cave inférieure au niveau du bord postérosupérieur du foie. Une partie du sang veineux hépatique se jette directement dans la veine cave inférieure rétrohépatique par des veines hépatiques accessoires issues des segments hépatiques adjacents.

2- Morphologie interne, segmentation et architecture hépatique

C'est en se basant sur la distribution intrahépatique de la veine porte que Claude Couinaud, chirurgien et anatomiste français, a décrit la segmentation du foie (Fig. 4). Cette segmentation est déterminée par des plans virtuels. On distingue ainsi un lobe droit défini par les segments V, VIII, VI et VII, un lobe gauche se divisant en segments II, III, IV et un lobe caudé (de Spiegel) correspondant au segment I. Ces divisions anatomiques sont importantes pour les interventions chirurgicales : lorsqu'une partie du foie est endommagée et doit être extraite, la résection suit souvent ces contours anatomiques.

Plusieurs approches peuvent être utilisées pour décrire l'architecture hépatique du point de vue histologique (Fig 5): l'acinus hépatique, le lobule portal et le lobule hépatique.

- L'acinus hépatique est décrit comme le triangle virtuel formé par un espace porte et deux veines centrolobulaires, et a été proposé par Rappaport en 1957. Cette unité fonctionnelle centrée sur le canal sécréteur, c'est-à-dire le canal biliaire est plus conforme à la structure généralement admise pour les glandes exocrines.
- Le lobule portal est représenté par un triangle dont chaque sommet est composé d'une veine centrolobulaire et dont le centre est l'espace porte.
- Le lobule hépatique est cependant l'unité fonctionnelle du foie. Présentant une veine centrolobulaire en son centre, le lobule hépatique, d'environ 250 µm de diamètre, est hexagonal, chaque sommet étant constitué de la triade de vaisseaux des espaces portes, une veine porte, une artère hépatique et un canal biliaire. Les hépatocytes irradient en travées de la veine centrolobulaire aux espaces portes. Cette conception permet d'appliquer une zonation des hépatocytes en fonction de leur proximité de la veine



Tiré de Gray's Anatomie pour les étudiants, Richard L. Drake (traduit de Drake, Vogl, Mitchell, Gray's Anatomy for Students, 2nd ed, 978044306952). Elsevier Masson, 2e édition, 2011.

Figure 4 : Segmentation du foie selon Couinaud

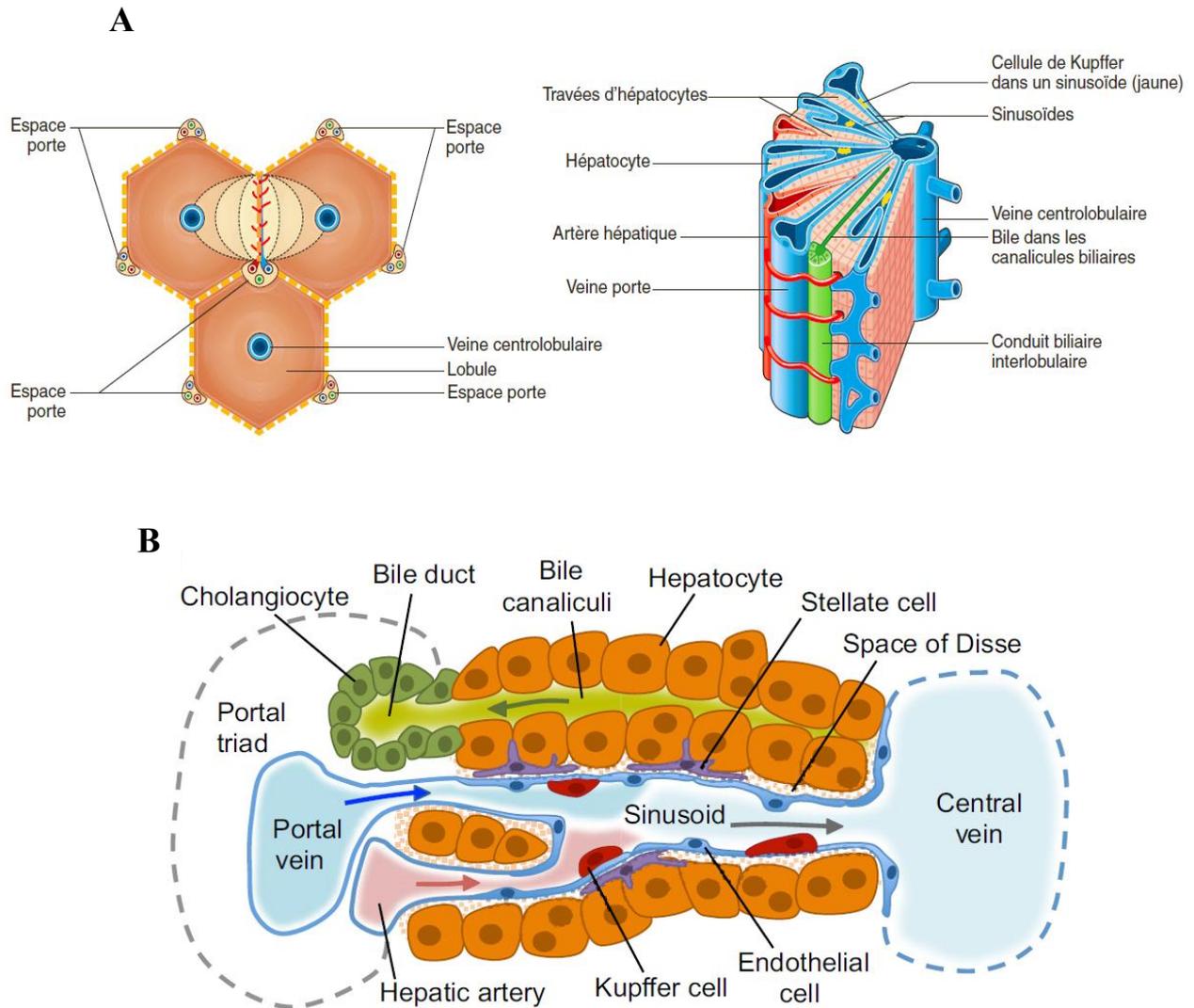
centrolobulaire ; il existe donc la région périportale (ou périlobulaire), la région médiolobulaire et la région centrolobulaire. On peut aussi définir cette zonation en fonction de l'apport en oxygène : la région centrolobulaire, constituée d'hépatocytes entourant la veinule centrolobulaire est la plus éloignée de l'apport de sang artériel oxygéné tandis que la région périportale, en périphérie du lobule, reçoit le sang artériel et le sang de la veine porte provenant de l'intestin. La circulation est centripète depuis l'espace porte jusqu'à la veine centrolobulaire. La bile progresse en sens inverse de façon centrifuge pour rejoindre les canaux biliaires situés dans les espaces portes. Les hépatocytes adjacents à l'espace porte, constituent la lame ou plaque limitante, et sont les premiers impliqués dans la détoxification des xénobiotiques et produits toxiques provenant de l'intestin ou de la circulation sanguine. Les capillaires sinusoides sont formés par des cellules fenêtrées (0,2 μm) afin de permettre aux grosses molécules (≥ 250 kDa) d'entrer au contact direct des hépatocytes dans l'espace de Disse qui est situé entre les capillaires et les lames d'hépatocytes. La composition des liquides remplissant l'espace de Disse est identique à celle du plasma sanguin.

3- Composition cellulaire

Le foie est un organe complexe constitué de plusieurs types cellulaires : les hépatocytes, les cholangiocytes, les cellules endothéliales, les cellules de Kupffer, les cellules stellaires, les cellules à granulation et les cellules ovales.

a) Les hépatocytes

Les hépatocytes sont les cellules les plus nombreuses du foie et représentent environ 60 à 70% du foie. De forme polyédrique et de type épithéliale, les hépatocytes présentent une polarisation avec un pôle sinusoidal (ou pôle basolatéral) en contact avec les sinusoides et un pôle biliaire (ou pôle apical) constitué par les canalicules biliaires. Les hépatocytes peuvent être mono- ou binucléés avec des contenus en ADN (diploïdie, tétraploïdie et octoploïdie...) variables selon l'âge et l'état du foie. Ils sont disposés en travées monocellulaires rayonnant à partir des veines centrolobulaires et séparés par des sinusoides hépatiques. Les hépatocytes ont un rôle métabolique majeur (notamment la synthèse de protéines, de lipides, de glucides, de la bile et de la détoxification). Ils interviennent également dans la réponse inflammatoire de phase aiguë et la coagulation sanguine.



Adapté de la revue de Miriam Gordillo et al. Development 2015.

Figure 5 : Images de l'organisation et composition cellulaire du foie. (A) Organisations structurelle et fonctionnelle du foie. (B) Composition cellulaire d'un lobule hépatique.

b) Les cholangiocytes

D'origine endodermique et dérivés d'un précurseur commun aux hépatocytes, l'hépatoblaste, les cholangiocytes représentent 3% des cellules du foie. Ce sont des cellules épithéliales qui forment les canalicules et la vésicule biliaire qui respectivement acheminent et stocke la bile.

c) Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales (Liver Sinusoidal Endothelial Cells, LSEC) proviennent également de l'endoderme et forment les sinusoides hépatiques. Elles reposent sur une fine trame conjonctive appelée trame réticulinique qui ne constitue pas une véritable membrane basale. Fenêtrés et dépourvus de membrane basale, les LSEC assurent ainsi aux hépatocytes un accès aux nutriments et aux macromolécules issus du plasma. Les cellules endothéliales, sont en contact avec le flux sanguin et forment une barrière permettant l'accès aux hépatocytes à l'espace de Disse.

d) Les cellules de Kupffer

Egalement appelées « macrophages résidents du foie », les cellules de Kupffer (KC) sont fusiformes et résident dans les sinusoides hépatiques. Les cellules de Kupffer sont ancrées à des structures sous-endothéliales dans l'espace de Disse par des pseudopodes. Ces cellules possèdent les caractéristiques morphologiques et les fonctions identiques aux macrophages, et sont donc capables de phagocytose. Elles ont pour rôle de phagocyter les particules étrangères qui arriveraient de l'intestin avant qu'elles ne gagnent la circulation générale. Les cellules de Kupffer participent aussi à la réponse immunitaire en sécrétant des médiateurs de l'inflammation (cytokines, prostaglandines) et des agents cytotoxiques comme des dérivés oxygénés. Elles représentent 15% des cellules du foie (Naito et al. 2004) et proviennent de précurseurs vitellin. En présence de GM-CSF et M-CSF, elles sont capables de s'auto-renouveler (Schulz et al. 2012) (Yona et al. 2013). Les KC jouent un rôle important dans la régénération (Van Hul et al. 2011) et au cours de l'atteinte hépatique (Boulter et al. 2012).

e) Les cellules stellaires

Aussi appelées cellules de Ito, les cellules stellaires (ou cellules étoilées) sont localisées dans les espaces de Disse, espaces entre les hépatocytes et les cellules endothéliales des sinusoides veineux. Dans le foie sain ces cellules prolifèrent peu, et ont un rôle dans le stockage des

rétinoïdes comme la vitamine A dans des gouttelettes lipidiques intracytoplasmiques, et dans la sécrétion de la matrice extracellulaire (collagène de type I, III et IV et MMP ou « Matrix Metalloprotéase »). En cas d'hypervitaminose A, la vitamine A peut s'accumuler dans les cellules stellaires. Ceci peut mener à une stéatose hépatique. De plus, lors de cytolyses hépatiques répétées, elles peuvent acquérir un phénotype activé notamment par le TGF- β produit par les cellules de Kupffer. Elles deviennent alors hyperprolifératives avec une morphologie de myofibroblastes et une sécrétion accrue de collagène. Ce mécanisme est impliqué dans la fibrose hépatique.

f) Les granulocytes

Les granulocytes (ou cellules à granulation) font partie des cellules composant la paroi sinusoidale. Elles ont des caractéristiques lymphocytaires et sont capables d'activité cytolytique.

g) Les cellules ovales

Les cellules ovales présentent de nombreuses caractéristiques des hépatoblastes, qui sont des précurseurs hépatiques fœtaux. Elles ont aussi la capacité de se différencier en hépatocytes ou en cellules biliaires et peuvent constituer une voie de secours pour la régénération du foie qui se met en place quand la capacité proliférative des hépatocytes est altérée. Leur origine reste encore très discutée, mais il est maintenant admis que, dans leur majorité, les cellules ovales résultent de l'expansion de précurseurs qui persistent à l'état de vestige dans le foie adulte au niveau des canaux de Hering (Theise et al. 1999).

h) La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est un réseau de fibres de collagène et de glycoprotéines qui forme l'architecture hépatique telle que l'espace de Disse, sur lequel s'attachent les différents types cellulaires. Les composants de la MEC sont différents types de collagène, des glycoprotéines (fibronectine, laminine...), des protéoglycanes et des glycosaminoglycanes (Schwarzbauer et al. 1999).

C) Fonctions hépatiques

Le foie assure le métabolisme des glucides, lipides et des protéines tout en sécrétant de la bile, élément essentiel à notre digestion. Véritable filtre, le foie récupère et élimine de nombreuses toxines. Celles-ci peuvent être naturellement présentes dans les déchets produits par notre organisme, comme l'ammoniac, ou dans ceux que nous ingérons, comme l'alcool. Le foie constitue également, un réservoir de vitamines (A, D, E, K) et de glycogène (glucides). Autrement dit, il stocke l'énergie sous forme de sucre, qu'il met à disposition de notre organisme. De plus, le foie produit des protéines (le fibrinogène, la prothrombine ou facteur II et les facteurs V, VII, IX et X) indispensables au processus de coagulation du sang.

Les hépatocytes ont tous le même aspect histologique, bien que leurs activités métaboliques diffèrent entre les régions centrales (périveineuses) et périphériques (périportales) du lobule. Les hépatocytes périportaux situés dans la partie externe du lobule, sont exposés à du sang riche en oxygène et en nutriments. Un métabolisme de type oxydatif prédomine dans ces cellules. A l'inverse, dans la région centrale du lobule où la pression partielle en oxygène est plus basse, les hépatocytes ont un phénotype différent et répondent d'une manière différente aux xénobiotiques et à l'hypoxie. Cette systématisation est pourtant plus souple qu'il n'y paraît, et l'hépatocyte peut participer à toutes ces fonctions métaboliques suivant sa position dans le lobule et selon les besoins de l'organisme.

1- Métabolisme glucidique

Le foie joue un rôle majeur dans le métabolisme du glucose, permettant de maintenir sa concentration plasmatique dans une fenêtre étroite, tant dans la période postprandiale que dans la période de jeûne. Le foie métabolise 25 à 30 % du glucose absorbé lors des repas pour l'oxyder, le stocker sous forme de glycogène ou le transformer en lipides. Entre les repas, le foie fournit l'essentiel du glucose nécessaire au métabolisme du système nerveux central et d'autres organes en dégradant le glycogène (glycogénolyse) ou en formant du glucose à partir d'autres précurseurs (néoglucogenèse).

Au niveau des hépatocytes périportaux, le glucose utilisé pour la synthèse de glycogène est fabriqué dans la cellule à partir de sources non glucidiques comme le lactate, les acides gras et les acides aminés par la voie de la néoglucogenèse. A l'inverse, la synthèse de glycogène dans les hépatocytes périportaux (situés près de la veine centro-lobulaire) est réalisée à partir du glucose présent dans les sinusoides. Ces hépatocytes possèdent également une activité de

glycolyse. Ainsi, l'hétérogénéité hépatocytaire permet une adaptation rapide du métabolisme glucidique par le foie en fonction de la glycémie : si la glycémie augmente, la glycogénosynthèse et la glycolyse périhépatique sont stimulées, alors que la néoglucogenèse périportale est diminuée; quand la glycémie diminue, la dégradation du glycogène et la néoglucogenèse périportale sont stimulées, alors que la glycolyse périhépatique est freinée. Le métabolisme hépatique des hydrates de carbone est contrôlé par les hormones pancréatiques (insuline et glucagon), par le système nerveux autonome et par la concentration en glucose des sinusöides.

L'insuline est sécrétée par les cellules pancréatiques β dans le système porte. Ainsi, la concentration d'insuline est environ trois fois plus élevée dans le sang portal que dans le sang périphérique. Le foie capte 50 à 80 % de l'insuline lors de son premier passage. Dans les suites d'un repas riche en hydrates de carbone, la concentration hépatique (sinusoïdale) de l'insuline augmente de 4 à 10 fois, ce qui conduit à la forte réduction de la production endogène de glucose. Le principal mécanisme impliqué est une augmentation de la formation de glycogène à partir du glucose. Accessoirement, l'augmentation de la concentration d'insuline conduit à une inhibition de la protéolyse et de la lipolyse, réduisant les substrats de la néoglucogenèse. Le glucagon est sécrété par les cellules pancréatiques α dans le sang portal. Toutefois, à la différence de l'insuline, le foie ne dégrade que 15 à 20 % du glucagon lors de son premier passage. La sécrétion de glucagon est stimulée par l'hypoglycémie, les acides aminés et le système parasympathique. Le glucagon augmente la production endogène de glucose en favorisant la glycogénolyse. L'homéostasie du glucose est assurée entre autres par les effets antagonistes de l'insuline et du glucagon.

2- Métabolisme lipidique

Les lipides forment un ensemble hétérogène constitué de triglycérides (TG), de phospholipides (PL), de cholestérol libre (CL) et de cholestérol estérifié (CE). L'acide gras (AG) est l'élément structural commun. Les lipides assurent un rôle énergétique, structural et fonctionnel.

Le foie joue un rôle fondamental dans l'homéostasie des lipides. Le foie possède les fonctions de catabolisme et d'anabolisme des triglycérides et des phospholipides. A l'état basal, le foie tire 75% de son énergie des AG libres qu'il transforme en acétyl-CoA par β -oxydation en présence de coenzyme A et de choline. Par exemple lors du jeûne, des AG libres issus de la transformation des triglycérides stockés dans les adipocytes sont oxydés dans les hépatocytes

pour servir de source d'énergie. La lipolyse régulée par le niveau de phosphorylation de la lipoprotéine lipase (LPL), s'établit dans les mitochondries et est strictement aérobie. La LPL est régulée par la concentration de glucagon et d'insuline. L'acéto-acétate résultant de l'oxydation des AG est ensuite exporté dans le sang ou il permettra d'alimenter en énergie les autres tissus.

Les lipoprotéines sont des protéines de transport qui diffèrent par leur taille, la quantité de cholestérol qu'elles transportent et leur liaison avec des apoprotéines : i) VLDL (25-70 nm, constituées de TG, cholestérol, apoprotéines C), ii) LDL (TG, cholestérol, apoprotéines E) et iii) HDL (beaucoup de cholestérol, phospholipides, apoprotéines E et A1). Les VLDL et HDL assemblées dans le foie sont sécrétées dans le plasma.

Le foie est le principal organe de synthèse et d'élimination du cholestérol, il produit plus de 90% du cholestérol endogène. L'hépatocyte synthétise le cholestérol à partir de l'acétyl-CoA. Il peut être stocké dans l'hépatocyte sous forme d'ester de cholestérol qui sera utilisé pour la synthèse des sels biliaires, incorporé dans les lipoprotéines HDL ou VLDL ou éliminé directement dans la bile. Le cholestérol utilisé par l'organisme provient pour 1/3 de l'alimentation et pour les 2/3 de sa synthèse endogène. Le cholestérol est présent dans toutes les membranes cellulaires sous forme de stérol libre. Dans le plasma et les tissus il est sous forme d'esters de cholestérol.

3- Métabolisme protéique

Le foie synthétise l'essentiel des protéines circulantes, à l'exception des immunoglobulines, de nombreuses protéines indispensables à l'homéostasie de l'organisme dans les domaines du transport cellulaire, de l'hémostase, de la réponse inflammatoire et immunitaire.

Le foie est capable d'effectuer des désaminations et transaminations, ainsi que l'oxydation des acides aminés issus d'un repas et leur conversion en molécules de glucose. L'oxydation des acides aminés permet de fournir la moitié des besoins énergétiques du corps. De plus, le foie est le seul organe capable d'effectuer un cycle de l'urée complet, qui permet d'éliminer l'ammoniaque issu de la désamination des acides aminés. La transamination est médiée par des enzymes particulières : l'alanine aminotransférase (ALT) (transformation de l'alanine en pyruvate) et l'aspartate aminotransférase (AST) (transformation de l'aspartate en oxaloacétate) et permet l'entrée d'acides aminés dans le cycle de Krebs et la production d'énergie. Le métabolisme des acides aminés est lui aussi soumis à une zonation. En effet les hépatocytes

périportaux expriment la glutaminase, enzyme responsable de la désamination de la glutamine, tandis que l'expression de la glutamine synthétase est restreinte aux hépatocytes périverseux, ce qui permet de contrôler que, le taux d'ammoniaque du sang quittant le foie, soit bas. En clinique, des taux plasmatiques élevés d'ALT et d'AST sont la résultante d'une atteinte hépatique, qui peut être le signe d'une pathologie.

Les principaux transporteurs synthétisés par le foie, sont l'albumine (transporteur de la bilirubine et de nombreuses hormones, des acides gras libres), les transporteurs des hormones stéroïdiennes (binding protein ou BP), les apolipoprotéines A, B, C et E, également impliquées dans le transport des lipides. Le foie synthétise également des facteurs modulant la coagulation (le fibrinogène, la prothrombine ou facteur II et les facteurs V, VII, IX et X), les protéines de la réponse inflammatoire et immunitaire telles que les protéines de la phase aiguë de l'inflammation (notamment protéine C-réactive ou C-reactive protein CRP, ferritine, sérum amyloïde A, α -2-macroglobuline) et certaines globulines.

4- Synthèse et sécrétion de la bile

La formation de la bile résulte de trois mécanismes distincts : une sécrétion hépatocyttaire dépendante des acides biliaires (40 % de la sécrétion biliaire); une sécrétion hépatocyttaire indépendante des acides biliaires (35 %); une sécrétion cholangiocyttaire (25 %). La bile est composée d'eau à 97% et ses composants non aqueux sont essentiellement représentés par les acides biliaires, les phospholipides, le cholestérol, la bilirubine, des protéines et des ions, en particulier de bicarbonate. Sa formation est à la fois un mode d'élimination par le foie de produits du catabolisme qui ne sont pas éliminés par le rein et, d'autre part, une sécrétion exocrine essentielle aux fonctions de digestion et d'absorption du tube digestif. La production quotidienne de bile représente un volume d'environ 600 ml.

Les acides biliaires constituent la principale voie d'élimination du cholestérol dans l'organisme. Chaque jour, environ 500 mg de cholestérol sont transformés en acides biliaires dans le foie. La transformation du cholestérol en acides biliaires dépend principalement de l'activité du cytochrome P7A1 (CYP7A1). Les acides biliaires sécrétés dans la bile par les hépatocytes sont l'objet d'un cycle entérohépatique. En effet, 90 % environ des acides biliaires sont réabsorbés au niveau de l'intestin grêle, soit par diffusion passive, soit dans l'iléon par un transport faisant intervenir la protéine de transport ASBT (« Apical sodium dependent-bile acid transporter »). Environ 10% des acides biliaires parviennent au côlon où ils sont déconjugués par l'action du

microbiote intestinal. Cette déconjugaison aboutit à la formation d'acides biliaires dits « secondaires » : l'acide désoxycholique et l'acide lithocholique. Ces acides biliaires secondaires sont à leur tour réabsorbés par le côlon et regagnent le foie par la veine porte. L'acide désoxycholique est transformé en acide chéno-désoxycholique puis en acide urso-désoxycholique qui est un acide biliaire tertiaire. Au sein des hépatocytes, les acides biliaires secondaires et tertiaires sont conjugués à la taurine et à la glycine puis ré-excrétés dans la bile.

Dans la lumière de l'intestin grêle, la principale action de la bile, est la solubilisation des lipides intraluminaux et des vitamines liposolubles sous forme de micelles augmentant fortement leur diffusion vers la membrane des entérocytes. Les acides biliaires ont un rôle plus accessoire dans la digestion des protéines alimentaires. Ils s'adsorbent en effet sur les domaines hydrophobes des protéines, favorisant la dénaturation de ces protéines et leur digestion par les enzymes protéolytiques.

5- Détoxification

Le foie est le siège principal de la détoxification. Le métabolisme des médicaments ou autres xénobiotiques (substances étrangères à l'organisme) correspond à l'ensemble des réactions enzymatiques permettant la biotransformation d'une molécule souvent insoluble, non excrétable dans sa forme primitive, en un ou plusieurs métabolites, pouvant être éliminés par voie biliaire ou rénale. Ces métabolites peuvent avoir une activité pharmacologique ou non et certains sont toxiques pour les cellules. Les médicaments absorbés au niveau intestinal vont être transformés au sein des hépatocytes avant de parvenir à la circulation générale. Cette biotransformation a lieu dans les microsomes des hépatocytes selon deux phases réactives : la phase de transformation chimique (phase I) et la phase de conjugaison (phase II). L'ensemble de ces deux phases n'est pas obligatoire pour métaboliser un médicament.

- Réaction de phase I : Ce sont des réactions (oxydation, réduction et hydrolyse) qui permettent de démasquer un site réactif pour une éventuelle conjugaison : on parle de fonctionnalisation. L'oxydation est la réaction de phase I la plus fréquente, médiée principalement par des mono-oxygénases à noyau héminique, les cytochromes P450 (CYP450). Les CYP450 catalysent une oxydation en utilisant de l'oxygène et du NADPH.

- Réaction de phase II : Grâce à des transférases, elle consiste à transférer sur un site réactif des groupes sulfate, méthyl, acétyl, ou glycuronate, ce qui augmente l'hydrosolubilité de la molécule transformée : on parle alors de sulfo-conjugaison, d'alcylation, d'acétylation ou de glucuro-conjugaison. Le glutathion peut aussi intervenir dans la détoxification des médicaments. Il est transféré par les glutathion-S-transférases.

Le polymorphisme génétique intervient dans la capacité d'élimination des médicaments. Par exemple, certains individus ont des capacités d'acétylation plus ou moins importantes. Par ailleurs, 8 % de la population ont une capacité réduite d'hydroxylation et les capacités métaboliques diminuent également avec l'âge.

II- Pathophysiologie du foie

A) Généralités

Le foie, compte-tenu de ses fonctions, est exposé à une panoplie de molécules potentiellement toxiques (alcool, xénobiotiques, produits du métabolisme...) mais est également le site de développement de pathogènes tels que *Plasmodium*, l'agent de la malaria, les schistosomias et des virus hépatites B et C responsables des hépatites virales. Ainsi, une multitude de pathologies d'étiologie toxique/métabolique, auto-immune ou virale, peuvent affecter le foie (Talwani et al. 2011). Une des plus fréquentes est l'hépatite, caractérisée par une inflammation du parenchyme hépatique, associée à une nécrose plus ou moins étendue des hépatocytes (élévation des transaminases). L'hépatite aiguë est marquée par une augmentation transitoire des transaminases (quelques semaines) et évolue souvent spontanément vers la guérison en 3-4 semaines (normalisation des paramètres du bilan hépatique). Quant à l'hépatite chronique, elle désigne une inflammation évolutive du foie qui dure depuis plus de six mois. Elle peut succéder à une hépatite aiguë, mais plus souvent, la phase aiguë est passée inaperçue et la maladie est découverte chez un patient qui se plaint d'asthénie, ou à l'occasion d'un bilan systématique.

B) L'hépatite chronique : de la fibrose à la cirrhose hépatique

Le foie régénère habituellement après une lésion hépatique. Cependant, lorsque les lésions et l'inflammation du foie sont persistantes et progressives, le foie ne peut pas se régénérer

normalement et provoque une fibrose. La fibrose est une réaction de cicatrisation qui se produit par des dépôts de matrice extracellulaire (MEC) tels que des fibres de collagène I et III (types IV et VI dans un foie normal) (Bataller et al. 2005, Hernandez-Gea et al. 2011) ainsi que d'autres composants, dont la fibronectine et la laminine (Parola et al. 1993). Selon l'ampleur de l'atteinte hépatique, la fibrose peut être plus ou moins importante. Le stade F1 désigne une fibrose légère tandis que le stade F3 caractérise une fibrose sévère. On parle de cirrhose à partir du stade F4, lorsqu'une quantité exagérée de tissu cicatriciel associée à des nodules de régénération sont présents dans le foie (Kleiner et al. 2005). La fibrose hépatique progressive entraîne une cirrhose où les cellules du foie ne peuvent plus fonctionner correctement, en raison de la formation de cicatrices fibreuses et de nodules de régénération et la diminution de l'apport sanguin au foie (Bataller et al. 2005, Hernandez-Gea et al. 2011). Cette désorganisation de l'architecture du foie, associée à une perte de l'homéostasie cellulaire, induit une insuffisance hépatocellulaire et rénale, la formation d'ascite, une encéphalopathie (signe de la diminution de la capacité de détoxification du foie) et une hypertension portale. Ce bilan clinique augmente significativement le risque de développer un carcinome hépatocellulaire (CHC) (Schuppan et al. 2008).

La fibrose hépatique met des années à se développer chez la plupart des patients et est souvent liée à l'abus d'alcool, des désordres métaboliques, la résistance à l'insuline, le diabète ou d'étiologie virale notamment le VHC et/ou VHB. Dans la majorité des cas, la progression vers le stade cirrhotique se fait sur une période longue, de 15 à 20 ans. Bien qu'une cirrhose compensée (maladie sans complication) soit asymptomatique dans 40% des cas, une cirrhose décompensée est associée à une espérance de vie courte, et dans ce cas, la transplantation hépatique reste la seule solution thérapeutique envisageable et efficace (Davis et al. 2003).

Une enquête réalisée aux Etats-Unis entre 1999 et 2010 par le CDC (« Centers for Disease Control and Prevention ») a estimé la prévalence de la cirrhose hépatique à 0,27% de la population dont 69% n'étaient pas au courant d'être atteint d'une maladie du foie et 53,5% des cas concernent des hépatites virales, le diabète, et l'abus d'alcool. En France, une étude a montré que la prévalence de la fibrose était de 1,3% et la cirrhose de 0,3% dans une population constituée à 95% d'hommes âgés de plus de 41 ans (Poynard et al. 2010). Bien qu'une cirrhose avancée soit très difficile à traiter, la fibrose peut être reversée même si à ce jour, il n'y a pas de médicament anti-fibrotique approuvé.

1- Principales étiologies de la fibrose hépatique

a) La maladie alcoolique du foie

La principale cause de cirrhose en Europe est la consommation chronique d'alcool. Selon un rapport de l'organisation mondiale de la santé de 2013 (Status Report on Alcohol and Health in 35 European Countries), l'Europe est la première consommatrice d'alcool dans le monde avec une moyenne de 10 litres d'alcool par personne et par an. L'incidence de la cirrhose est 9 fois supérieure chez les patients qui présentent une hépatite alcoolique en comparaison aux patients souffrant de stéatopathies. Toutefois, l'hépatite alcoolique ne se développe que chez une fraction de forts consommateurs. En effet, 30 à 35% des forts consommateurs développent une fibrose avancée ou une cirrhose. Ainsi, la prévalence de la fibrose dans la maladie alcoolique du foie est établit à environ 8% (Poynard et al. 2010, Gao et al. 2011).

b) Les hépatites virales B et C

L'infection par le VHB et/ou le VHC reste un problème de santé publique, non seulement en raison de sa nature silencieuse, mais aussi en raison des complications associées. La cirrhose se produit dans 20 à 30% des patients chroniquement infectés par le VHB (Cadranet et al. 2007 , Mota et al. 2011) avec environ 25% de risque de développer un CHC. Plus de 45% des cancers du foie sont liés à une infection chronique par le VHB. En France, le taux de mortalité par une infection par le VHB est de 2,5 personnes pour 100000 habitants (Garcia-Fulgueiras et al. 2009) (Cairo et al. 2008). Quant à l'hépatite C, l'histoire naturelle de la maladie montre que plus de 80% des patients infectés développent une infection chronique, et 10 à 20% évoluent vers une cirrhose (Westbrook et al. 2014).

c) Les hépatopathies stéatosiques dites non-alcooliques

Les NAFLD (« Non alcoholic fatty liver disease ») sont caractérisées par une surcharge graisseuse au niveau du foie dont le spectre va de la stéatose à la stéatohépatite pour conduire à une cirrhose voire au développement d'un carcinome hépatocellulaire. Ces pathologies deviennent des problèmes de santé publique en Europe et sont notamment liées à l'augmentation de l'incidence de l'obésité. L'accumulation de lipides dans le foie entraîne donc des pathologies hépatiques chroniques. Parmi celles-ci, la stéatohépatite non-alcoolique (NASH ou « Non alcoholic steatohepatitis »), est caractérisée par une stéatose associée à une inflammation. La NASH peut présenter différentes stade de fibrose allant de son absence (stade

F0) à la cirrhose (stade F4) avec une progression en cirrhose chez environ 10 à 15% des patients qui en souffrent (Ekstedt et al. 2006). Les données disponibles suggèrent une prévalence de la NAFLD entre 2 et 44% dans la population générale d'Europe (en incluant les enfants obèses) et de 42,6 à 69,5% chez des personnes ayant un diabète de type 2.

2- Mécanismes cellulaires et moléculaires de la fibrose

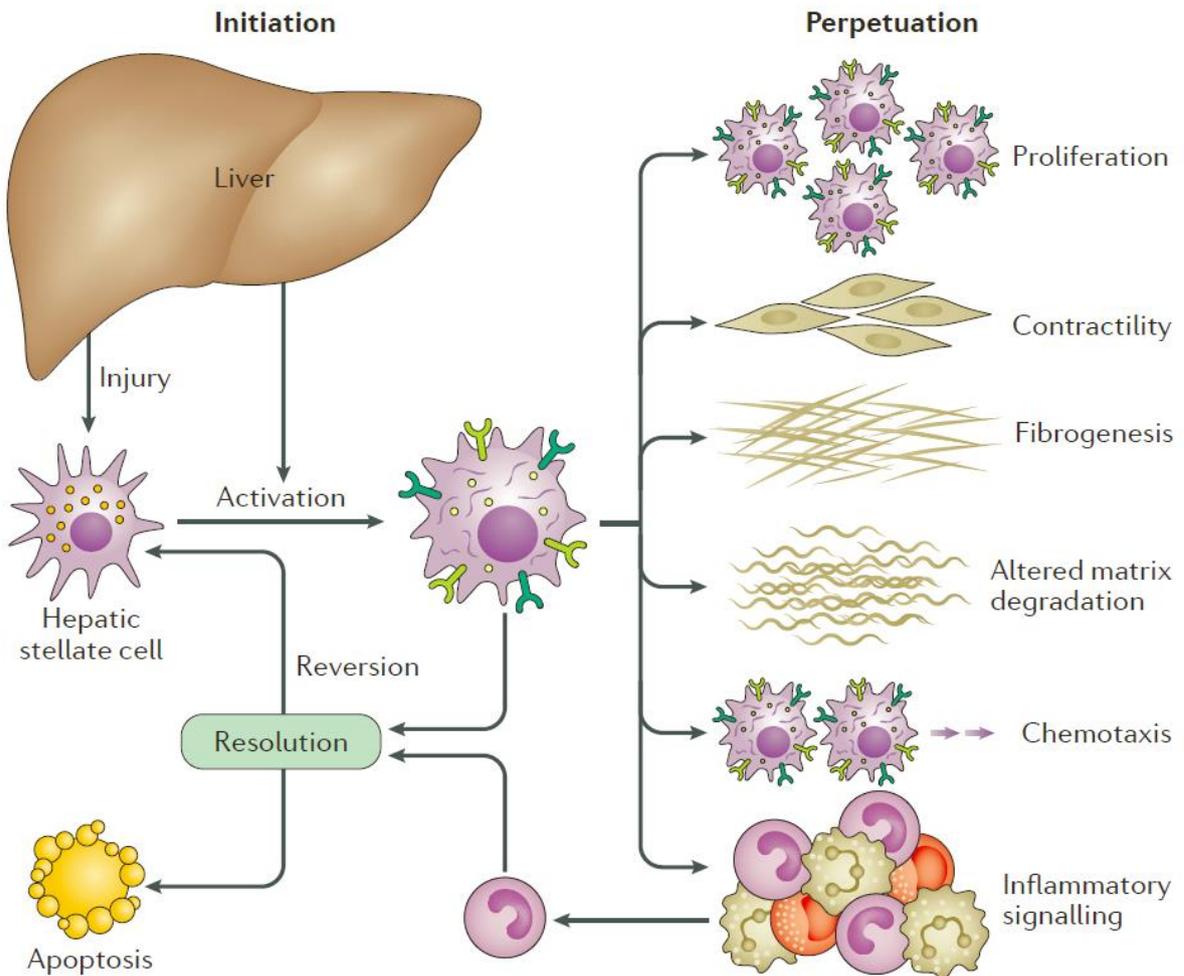
Des travaux récents ont révélé que l'accumulation de la MEC lors d'une fibrose hépatique, est régulée par une population cellulaire hétérogène. Actuellement, il est admis que les cellules stellaires hépatiques (HSC ou « Hepatic stellate cell ») sont le principal précurseur des myofibroblastes (MFs) activés, le type cellulaire qui produit des protéines de MEC pendant la fibrose hépatique. En effet, dans le tissu hépatique normal, les HSC sont dans un état quiescent, stockant des rétinoïdes et synthétisant la protéine GFAP (« Glial fibrillary acidic protein ») (Guyot et al. 2006, Sachs et al. 2007). À la suite d'une lésion hépatique, les HSC sont activés par perte progressive de rétinoïdes et de GFAP, entraînant une réduction de l'expression des facteurs adipogéniques/lipogéniques. Sous l'effet de signaux fibrogéniques autocrine/paracrine, les HSC subissent une trans-différenciation en un phénotype myofibroblastique (Li et al. 2015).

a) Les acteurs de la fibrogenèse

Au stade précoce de l'atteinte hépatique, tous les types cellulaires voisins peuvent contribuer à la fibrogenèse hépatique par l'activation des HSC. L'activation des HSC se fait en deux étapes (Fig 6.): la phase d'initiation et la phase de perpétuation. La phase d'initiation se réfère aux changements induits au niveau, à la fois, de l'expression géniques et aussi du phénotype qui rendent ces cellules sensibles aux stimuli cytokiniques. La phase de perpétuation est le résultat des effets de ces stimuli sur le maintien du caractère activé et donc sur la production de la fibrose (Friedman 2008).

- **Les hépatocytes**

Au cours de l'atteinte hépatique, les hépatocytes endommagés s'engagent dans l'apoptose, (Canbay et al. 2004, Sanchez-Valle et al. 2012). Différents travaux ont montré que, l'internalisation de corps apoptotiques hépatocytaires par des HSC, entraîne leur activation et



Tiré de la revue de Takuma Tsuchida et Scott L. Friedman, *Nature Review Gastroenterology and Hepatology*, 2017.

Figure 6 : Fonctions, caractéristiques et phénotypes des HSCs dans un foie sain et dans un foie malade.

aussi celle des cellules de Kupffer conduisant à une réponse profibrogénique (Canbay et al. 2003, Canbay et al. 2003). L'activation des HSC par des corps apoptotiques dérivés d'hépatocytes est partiellement médiée par l'interaction de l'ADN (motif CpG DNA) contenu dans les corps apoptotique et le TLR9 exprimé par les HSC (Guicciardi et al. 2010). D'autres études ont rapporté que le raccourcissement des télomères et la sénescence des hépatocytes participent également à la fibrose et à la cirrhose hépatique (Wiemann et al. 2002).

- Les cellules immunitaires

Les cellules de Kupffer et les monocytes infiltrés jouent un rôle important dans la progression ou la résolution de la fibrose par l'expression d'un certain nombre de récepteurs de chimiokines (Bilzer et al. 2006 , Ramachandran et al. 2012). Des études *in vitro*, ont montré que les cellules de Kupffer peuvent activer les HSC par effet paracrine (Friedman et al. 1989). En effet, le TGF- β produit par les cellules de Kupffer, stimule la prolifération et la production de collagène par les HSC (Matsuoka et al. 1990, Matsuoka et al. 1990). De plus, les macrophages ayant une forte expression du marqueur Gr1 (Ly6C^{high}) seraient profibrogéniques (Seki et al. 2009, Ramachandran et al. 2012).

Le rôle des lymphocytes T notamment les CD4 « Helper », a également été rapporté dans l'activation des HSC. L'IL-17 est principalement produite par les cellules Th17 et surexprimée dans les hépatites B et C (Hammerich et al. 2011). L'IL-17 est une cytokine pro-inflammatoire et profibrogénique qui active NF- κ B et STAT3 dans les cellules de Kupffer et HSCs. Les HSC stimulés par l'IL-17 augmentent les niveaux de collagène α 1 (type I), d' α -SMA et de TGF- β , favorisant la fibrose hépatique (Meng et al. 2012). En effet, les souris déficientes en IL-17A ou IL-17RA sont résistantes à la cholestase et à la fibrose hépatique chimiquement induite (Meng et al. 2012). Les cellules Th17 produisent également de l'IL-22. Dans le foie, le récepteur à l'IL-22 est exprimé sur les hépatocytes et les HSC, mais pas sur les cellules immunitaires. Il a été démontré dans un modèle de souris transgénique que, la surexpression de l'IL-22 hépatique réduit la fibrose en induisant la sénescence des HSC (Kong et al. 2012). De plus, l'administration d'IL-22 protège les souris contre la fibrose induite par BDL (Bile duct ligation), alors que sa délétion l'exacerbe (Kong et al. 2012). Cependant, chez les patients cirrhotiques, les taux élevés d'IL-22 dans le sang sont en corrélation avec la gravité de la cirrhose et le taux de mortalité (Kronenberger et al. 2012).

- Les cellules endothéliales sinusoidales

En réponse à une lésion hépatique, les cellules endothéliales sinusoidales contribuent à l'activation des HSC, par leur capacité à produire de la fibronectine, du TGF- β 1 et du PDGF (March et al. 2009). De plus, une perte de la fenestration endothéliale participerait à l'activation des HSC (Puche et al. 2013).

Le TGF- β est considéré comme la cytokine fibrogénique la plus puissante et est libéré par plusieurs populations de cellules dans le foie sous une forme latente (Hellerbrand et al. 1999). La fixation de TGF- β à son récepteur, induit en aval, la phosphorylation SMAD3. Contrairement à SMAD7, la phosphorylation de SMAD3 lors de l'activation des HSC, favorise la transcription de collagène de type I et de type III (Breitkopf et al. 2006, Friedman 2008). Le TGF- β activerait les HSC via les voies de signalisation ERK, p38, JNK MAPKs (Engel et al. 1999).

Par ailleurs, le PDGF est un mitogène critique dans le foie et un chimioattractant qui induit la prolifération et la migration des HSCs. En effet, l'inhibition de l'expression du récepteur β de PDGF dans les HSCs, induit la diminution de dommages hépatiques et de la fibrose dans des modèles de fibrose induite soit par le CCL4 (« Carbon tetrachloride ») ou ligation du canal cholédoque (ou BDL « Bile duct ligation ») (Kocabayoglu et al. 2015).

b) Régulation métabolique des HSC

Les différentes études de la fibrose induite par traitement CCL4 (« Carbon tetrachloride ») ou BDL sur des souris transgéniques ou sauvages, ont révélé que l'activation des HSC pouvait être régulée par différentes voies métaboliques telles que :

- Autophagie et stress du RE

L'autophagie induit l'activation des HSC, en générant des acides gras à partir du clivage d'esters de rétinyles. En effet, la fibrogenèse et l'accumulation de la MEC sont considérablement réduites chez des souris dont les HSC sont déficients en ATG7 (« Autophagy-related protein 7 ») après traitement CCL4 mais ce phénotype peut être réversé par ajout d'acides gras aux HSC en culture (Hernandez-Gea et al. 2012). De plus, le traitement à la bafilomycine A1, un inhibiteur d'autophagie, réduit la capacité proliférative et l'expression de marqueurs d'HSC activés (Thoen et al. 2011).

Par ailleurs, d'autres études ont montré que les signaux de stress du RE potentialisant le développement de la fibrose, seraient liés à une augmentation de l'autophagie et à l'activation des HSCs (Hernandez-Gea et al. 2013 , Koo et al. 2016). En effet, la surexpression hépatique de la protéine GRP78 (« 78 kDa Glucose-regulated protein »), marqueur de stress du RE, via un vecteur lentiviral, réduit la fibrose induite par le CCL4 (Koo et al. 2016). De plus, l'inhibition de la voie IRE1- α (« Inositol-requiring Enzyme-1 α), une des branches de la réponse au stress du RE, limite le développement de la fibrose en empêchant l'activation des HSCs et leur activité autophagique via la voie p38 MAPK (Hernandez-Gea et al. 2013). De même, la surexpression de XBP1 (X-box binding protein 1), facteur de transcription en amont de IRE1- α , induit dans les HSCs, l'expression de collagène de type 1 qui disparaît lorsque la protéine ATG7 est génétiquement éteinte (Kim et al. 2016).

D'autres voies de signalisation activées par le stress du RE, sont les voies PERK (« PKR-like endoplasmic reticulum kinase »), JNK (« c-Jun N-terminal kinases ») qui participeraient également à l'activation des HSCs. En effet, le stress du RE peut participer au développement de la fibrose via la dérégulation du miR-18A par la voie PERK et la déstabilisation de hnRNPA1 (Koo et al. 2016). De même, il a été démontré que la protéine JNK1 des HSCs et non celle des hépatocytes participe à la fibrose induite par le CCL4 ou par BDL (Kluwe et al. 2010).

- Stress oxydatif

Le stress oxydatif est une caractéristique de l'hépatite chronique et son rôle dans l'activation des HSCs a été rapporté (Novo et al. 2008, Novo et al. 2011). En effet, les ROS (« Reactive oxygen species ») produits par des hépatocytes endommagés fournissent des signaux d'activation paracrine aux HSCs (Puche et al. 2013). En activant les voies de transduction du signal et les facteurs de transcription tels que JNK et NF κ B, les ROS augmentent l'expression de Col1a1/2, MCP1 et TIMP1 dans les HSCs (Zhang et al. 2012 , Shah et al. 2013). Ces ROS sont générés en réponse aux différents stimuli par le complexe enzymatique NOX (« NADPH oxidase »). Ainsi, les souris déficientes en NOX1 ou NOX4 développent peu de lésions hépatiques, moins d'inflammation et de fibrose après un traitement au CCL4 (Lan et al. 2015). La molécule GKT137831, en essai clinique de phase II pour la néphropathie diabétique, est un inhibiteur de NOX1 et 4 car son administration chez la souris, réduit la fibrose et l'apoptose hépatique (Aoyama et al. 2012). Cette molécule pourrait être envisagée dans le traitement de l'hépatite chronique.

- Le métabolisme du rétinol et du cholestérol

Bien que l'accumulation de rétinoïdes (vitamine A) sous forme d'esters de rétinyles soit une des caractéristiques des HSCs, la contribution de ces gouttelettes lipidiques dans l'activation des HSC n'est pas encore totalement élucidée. En effet, le rétinol est converti en esters de rétinyles par la LRAT (« Lecithin:retinol acyltransferase ») et les souris déficientes en LRAT ne produisent pas de rétinoïdes (Kluwe et al. 2011). De façon surprenante, une étude a montré que les souris déficientes en LRAT présentent le même degré de fibrose que les souris sauvages après BDL ou traitement CCL4. Cependant, la déficience en LRAT sensibilise moins les animaux au traitement par le diéthyl-nitrosamine (DEN) suggérant que la perte de rétinoïdes dans les HSCs ne participerait pas à leur activation mais à la réduction de la carcinogénèse hépatique (Kluwe et al. 2011). Le rôle des ADH (« Alcohol dehydrogenases ») responsable de l'oxydation du rétinol en rétinaldéhyde, a également été évoqué dans la fibrose. Ainsi, l'inhibition de l'ADH3 par le 4-méthylpyrazole (4-MP) *in vitro* ou sa déplétion génétiquement, limitent l'apparition de fibrose (Yi et al. 2014).

Le cholestérol libre active les HSCs et l'ajout de cholestérol à un régime gras ou MCD (« Methionine-choline-deficient diet») conduit à l'accumulation de cholestérol libres dans les HSCs, ce qui accélère la fibrose hépatique (Tomita et al. 2014). De plus, les souris soumises à un régime riche en cholestérol présentent un niveau élevé de fibrose et d'activation des HSCs, après induction chimique ou BDL (Teratani et al. 2012). En effet, l'enzyme ACAT (« Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase ») catalyse la conversion du cholestérol libre en ester de cholestérol empêchant ainsi une accumulation excessive de la forme libre. Une déficience en ACAT1 entraîne un taux élevé de cholestérols libres dans les HSCs, une suractivation de la signalisation TLR4 et une inhibition de la protéine BAMBI (« Bone morphogenetic protein and activin membrane bound inhibitor ») conduisant à la sensibilisation des HSCs à l'activation par le TGF- β (Tomita et al. 2014). Il a été démontré dans un modèle de souris NASH, que les médicaments anti-cholestérol (par exemple l'ézétimibe ou les statines) peuvent inverser l'accumulation de cholestérols hépatiques libres et atténuer la stéatohépatite et la fibrose (Van Rooyen et al. 2013), mais leur activité chez l'homme n'a pas encore été rigoureusement évaluée.

- Les adipocytokines

Les adipocytokines contribuent à la pathogénèse de la fibrose hépatique dans l'obésité et le NAFLD et peuvent agir directement sur les HSCs. On distingue les adiponectines qui ont des propriétés anti-fibrotiques fortes par opposition aux leptines qui sont fibrogéniques (Shafiei et

al. 2011, Saxena et al. 2015). Les souris déficientes en adiponectine traitées au CCL4, développent plus rapidement une fibrose avec une augmentation de TGF- β et de CTGF hépatique alors que la surexpression de l'adiponectine par un vecteur viral empêche la progression vers la fibrose. De plus, *in vitro*, l'adiponectine inhibe la prolifération et la migration des HSCs, induites par le PDGF (Kamada et al. 2003). En revanche, le traitement à la leptine induit l'augmentation de la transcription de α -SMA, Col1a1 et TGF- β dans les HSCs tandis que les souris *ob/ob* déficientes en leptine, nourries avec un régime MCD, développent peu de fibrose et présentent moins de cellules hépatiques positives pour α -SMA (Sahai et al. 2004, Coombes et al. 2016).

c) Régulation génique dans la fibrose

L'activation des HSCs induit des changements dans la transcription d'innombrables gènes tels que le collagène de type 1, l' α -SMA (« α -smooth muscle actin »), le TGF- β -1, les récepteurs de TGF- β , les MMP-2 (« Metalloproteinase), les TIMP 1 et 2 (« Tissue inhibitor of metalloproteinase ») (Rippe et al. 2004 , Tsukamoto et al. 2006) en aval via, les facteurs de transcription ETS-1, MEF-2, CREB, EGR-1, récepteur de la vitamine D, Foxf1, JunD et C/EBP- β (Friedman 2008). Les HSCs expriment également de nombreux récepteurs nucléaires, tels que le RXR et le RAR sensibles aux rétinoïdes, le FXR (« Farnesoid X receptor »), le PXR (« Pregane X receptor ») et le PPAR- γ (« Peroxisome proliferators-activated nuclear receptors γ ») (Lee et al. 2011 , Sharvit et al. 2013). Les récepteurs RXR et FXP sont décrits comme des inhibiteurs de la production de collagène. L'activation du PXR par des stéroïdes et des antibiotiques, induit une dimérisation du RXR favorisant la fibrose hépatique (Lee et al. 2011). En revanche, PPAR- γ réduit la production du collagène en empêchant l'activation des HSCs (Lee et al. 2011 , Sharvit et al. 2013). La répression de PPAR- γ serait induite par méthylation par la protéine MECP2 (« Methyl-CpG binding protein 2 ») via la voie WNT (Kweon et al. 2016).

Par ailleurs, l'expression des gènes impliqués dans la progression de la fibrose, serait également régulée par les micro-ARN notamment miR-29, miR-19b et miR-221/222 parmi tant d'autres (Lakner et al. 2012 , Ogawa et al. 2012). Des études du transcriptome ont révélé que l'expression de miR-29 (inhibiteur physiologique des protéines de la MEC comme le collagène) est inhibée par le TGF- β et le LPS dans les HSCs en culture (Roderburg et al. 2011, Lakner et al. 2012). Contrairement à miR-221/222 dont l'expression augmente avec la progression de la fibrose (Ogawa et al. 2012), il a été rapporté que l'expression de MiR-19b (inhibiteur de la

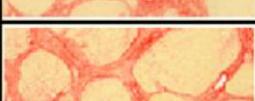
Appearance	Ishak stage: Categorical description	Ishak stage: Categorical assignment	Fibrosis measurement*
	No fibrosis (normal)	0	1.9%
	Fibrous expansion of some portal areas ± short fibrous septa	1	3.0%
	Fibrous expansion of most portal areas ± short fibrous septa	2	3.6%
	Fibrous expansion of most portal areas with occasional portal to portal (P-P) bridging	3	6.5%
	Fibrous expansion of portal areas with marked bridging (portal to portal (P-P) as well as portal to central (P-C))	4	13.7%
	Marked bridging (P-P and/or P-C), with occasional nodules (incomplete cirrhosis)	5	24.3%
	Cirrhosis, probable or definite	6	27.8%

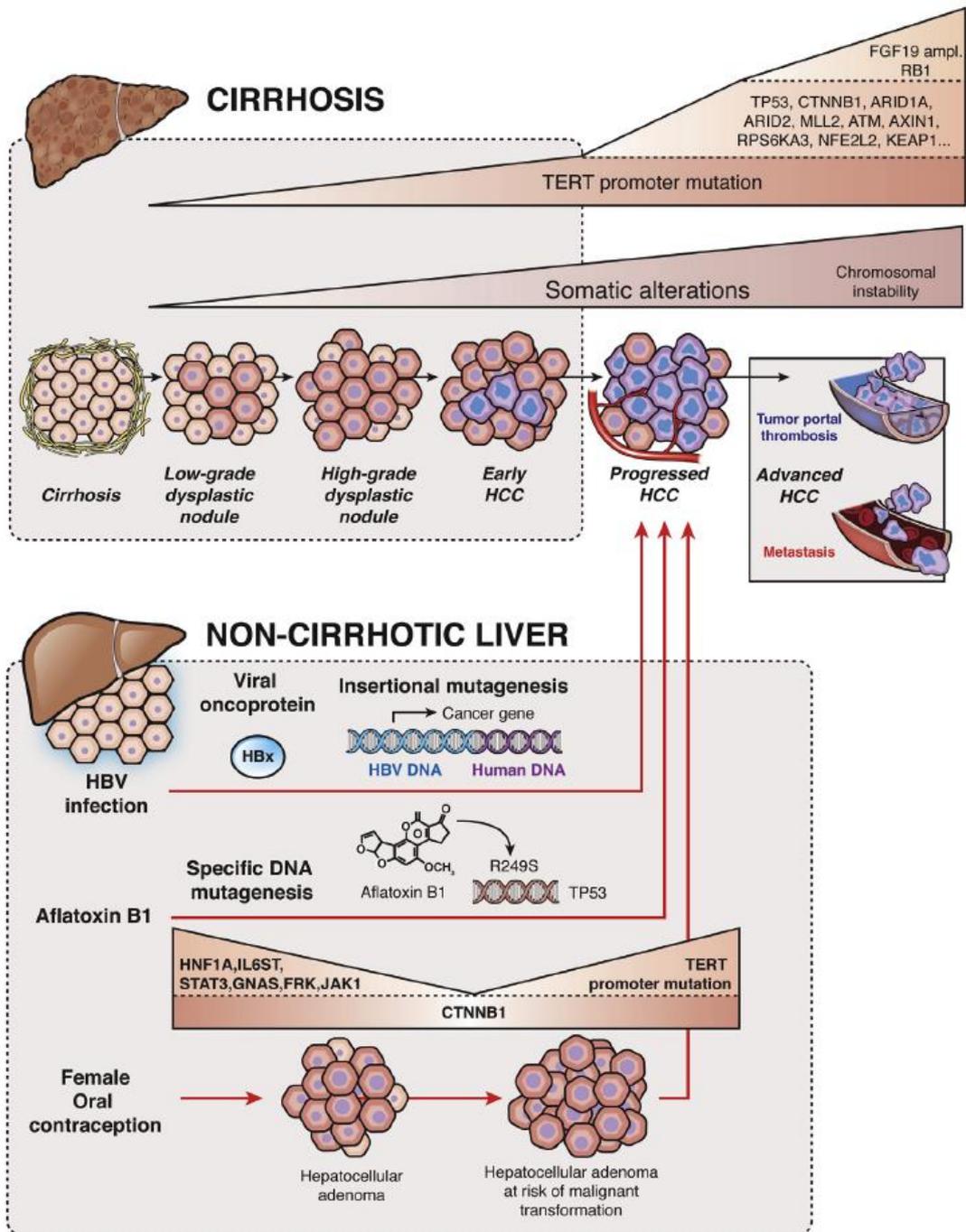
Figure 7 : Le score de Ishak. Quantification de la fibrose hépatique par coloration Picro-sirus.

signalisation TGF- β) diminue chez les patients atteints de fibrose avancée, tandis que sa surexpression dans les HSCs bloque leur activation (Lakner et al. 2012).

d) Diagnostic et traitements

Les premiers outils de diagnostic non invasif de la fibrose hépatique étaient basés sur la quantification des niveaux sériques d'enzymes hépatiques. Ainsi des mesures de phosphatase alcaline et de transaminases ont respectivement été développées en 1930 et 1955-1956. Sont ensuite apparues des techniques telles que l'ultra-sonographie, la tomographie et l'imagerie par résonance magnétique permettant de détecter des modifications du parenchyme (Hirata et al. 2001). Il est également possible d'estimer la fibrose par l'élastographie impulsionnelle à vibration contrôlée (FibroScan) qui détermine l'élasticité du foie. En effet, la rigidité du foie est corrélée à l'accumulation de composants de la MEC. Les approches non invasives peuvent être complétées par des analyses histologiques. Pour cela, le meilleur examen reste la biopsie hépatique (Afdhal et al. 2004) mais cette méthode possède plusieurs limites. Tout d'abord, la biopsie est une technique invasive qui peut entraîner des complications sévères (Cadranel et al. 2000). Ensuite, la petite taille des biopsies a tendance à induire des variabilités d'échantillonnage (Bedossa et al. 2003). Enfin, il peut y avoir des différences d'appréciation du stade fibrotique intra ou inter individuelles (Regev et al. 2002). Après coloration des coupes histologiques au rouge Sirius ou au trichrome de Masson, il est possible de déterminer la localisation et l'importance de l'accumulation de la MEC, ainsi que le stade de nécro-inflammation à l'aide des méthodes de classements telles que le score Metavir (stade 1 à 4) ou le score Ishak (stade I à V) (Fig. 7.).

En fonction de son stade, la fibrose peut être réversée. Retirer le facteur à l'origine des agressions responsables du développement fibrotique est la méthode la plus directe, et certainement la plus efficace, dans le traitement de la fibrose hépatique. Ainsi, les traitements contre les infections aux VHC et VHB (Berenguer et al. 2013), le sevrage alcoolique, le contrôle du poids corporel et des lipides dans le sang, la chélation de la surcharge en fer ou en cuivre (Hou et al. 2009), sont considérés comme des thérapies efficaces dans une large proportion des cas de fibrose hépatique. En particulier, les médicaments antiviraux tels que l'interferon (IFN)- α , les NA exercent des effets anti-fibrotiques (Degertekin et al. 2009, Poynard et al. 2009, Kim et al. 2010, Berenguer et al. 2013). Des thérapies supprimant l'inflammation (corticoïdes, antagonistes du TNF- α et d'IL-1...) ou l'activation des HSCs (antioxydants, antagonistes du PDGF et de TGF- β , ligand Fas...) sont en cours d'exploration.



Tiré de la revue de Jessica Zucman-Rossi et collaborateurs, *Gastroenterology*, 2015.

Figure 8 : Mécanismes de la transformation maligne dans le CHC

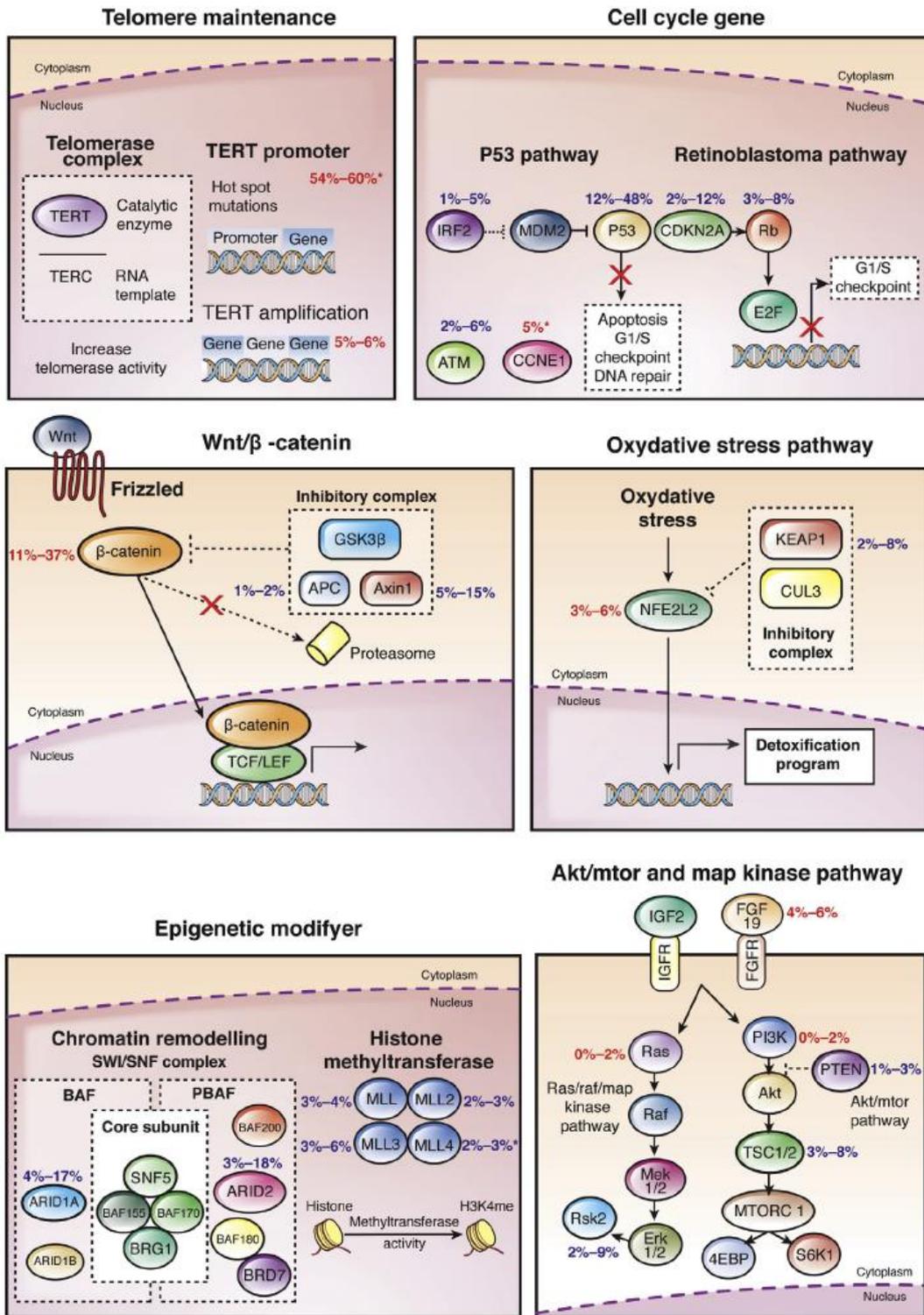
C) Vers le carcinome hépatocellulaire

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la forme la plus fréquente de cancer du foie et représente la deuxième cause de décès lié au cancer dans le monde (Cancer IARC. Globocan. World Health Organization; 2012) avec environ 500.000 morts par an (El-Serag et al. 2007 , Venook et al. 2010). Le développement du CHC est lié à l'interaction entre les prédispositions génétiques, les facteurs environnementaux (syndrome métabolique, alcool, aflatoxine B1, acide aristocholique) et les virus des hépatites B (VHB) et C (VHC) dont les infections représentent environ 80% des CHC (Alves et al. 2011 , El-Serag 2011 , El-Serag 2012). Bien que la plupart des CHC se développe sur un foie cirrhotique, reconnu comme un facteur pro-carcinogène, le CHC peut également se développer dans des foies non cirrhotiques suggérant ainsi l'implication de mécanismes distincts (Fig. 8.).

Les CHC se développent à partir de nodules pré-malins, et peuvent être classés en tumeurs bien différenciées, modérément ou peu différenciées correspondant à des CHC peu, modérément ou très avancés (Farber et al. 1987 , Su et al. 2003). Les traitements standards pour un CHC peu avancé, comme la résection chirurgicale et la transplantation hépatique peuvent permettre de soigner une certaine catégorie de patients, cependant, en raison de la nature asymptomatique du CHC peu avancé, et le manque de stratégies efficaces de dépistage précoce, 80% des patients ont un CHC avancé au moment du diagnostic. Ainsi seuls des traitements palliatifs sont proposés à ces patients (Thomas et al. 2005). Les chimiothérapies conventionnelles ont une efficacité limitée sur la progression tumorale. La mortalité du CHC avancé est donc élevée, et le taux de survie à 5 ans n'est que de 7% (Bosch et al. 2004 , Whittaker et al. 2010). L'identification de nouveaux marqueurs et le développement de nouvelles thérapies anti-cancéreuses ciblant les effecteurs de la tumorigenèse, demeurent un enjeu majeur pour une meilleure prise en charge des patients.

1- Caractéristiques et signalisations moléculaires de la carcinogenèse hépatique

Les cellules cancéreuses évoluent à partir de cellules normales après l'accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques discrètes dans les gènes contrôlant la prolifération et l'homéostasie tissulaire (Kinzler et al. 1996 , Hanahan et al. 2000). Plusieurs étapes du développement de la carcinogenèse ont été identifiées : l'initiation, la promotion et la progression tumorale. L'initiation correspond à la phase d'accumulation d'anomalies



Tiré de la revue de Jessica Zucman-Rossi et collaborateurs, *Gastroenterology*, 2015.

Figure 9 : Schéma génétique du CHC. En rouge, les mutations activatrices d'oncogènes et en bleu, les mutations inactivatrices de gènes suppresseurs de tumeur. (*) Les gènes fréquemment ciblés par l'intégration du VHB.

génétiques, elle est irréversible. Elle provoque des pertes ou des gains de fonctions cellulaires (activation ou dé-répression d'un oncogène, inactivation ou répression d'un gène suppresseur de tumeur) et est caractérisée par la genèse d'un mélange hétérogène de clones cellulaires altérés provenant à la fois de cellules souches et d'hépatocytes adultes (Lee et al. 2006). La promotion est la phase au cours de laquelle, la cellule reçoit des signaux de prolifération ou de survie. Ainsi, certains de ces clones sont sélectionnés et développés au stade de la promotion de la tumeur (Aydinlik et al. 2001, Calvisi et al. 2004). Les clones initiés évoluent ensuite en cellules progénitrices tumorales puis en cellules tumorales. Aux étapes ultérieures de la progression de la tumeur, les lésions néoplasiques gagnent un potentiel invasif et métastatique.

Selon le modèle de R. Weinberg et D. Hanahan, les cancers présentent des caractéristiques communes (Hanahan et al. 2000, Hanahan et al. 2011) et leur établissement passe par l'acquisition d'au moins six propriétés : 1) une prolifération non contrôlée, 2) l'insensibilité aux signaux anti-mitogènes, 3) la résistance à l'apoptose, 4) l'immortalisation, 5) l'induction de l'angiogenèse, 6) et l'acquisition d'un pouvoir invasif. L'acquisition de ces propriétés peut être la résultante d'une instabilité génomique et de l'inflammation. En plus de ces 6 caractéristiques, une reprogrammation du métabolisme énergétique de la cellule en faveur d'une multiplication incontrôlée et la capacité à échapper au système immunitaire, ont été évoquées (Fig. 9). Enfin, la notion de cancer comme une simple somme de mutations d'un clone cellulaire a largement évolué, en faveur d'une vision des tumeurs comme un organe à part entière, un tissu complexe composé de multiples types cellulaires, y compris normaux, participant à la mise en place d'un microenvironnement tumoral.

a) Les télomères et la télomérase

Différentes études ont montré le rôle clé des télomères et de la télomérase dans l'initiation de la tumorigenèse (Satyanarayana et al. 2004). Les télomères sont des séquences répétées d'ADN, essentielles pour la protection de l'extrémité des chromosomes (Calado et al. 2009). Leur raccourcissement durant la division cellulaire conduit à la sénescence cellulaire et à l'apoptose (Farazi et al. 2006). La synthèse des télomères nécessite la télomérase composée d'une matrice ARN appelée TERC et de l'enzyme TERT (Gunes et al. 2013). Dans le foie humain, la télomérase ne s'exprime pas dans les hépatocytes matures. Chez l'homme, une réactivation de la télomérase a été observée dans plus de 90% des CHC (Totoki et al. 2014) soit suite à des mutations somatiques du promoteur TERT (54 à 60%) (Nault et al. 2013, Totoki et al. 2014), soit une amplification de TERT (5 à 6%) ou suite à l'intégration du génome du VHB dans le

promoteur TERT (10 à 15%) (Paterlini-Brechot et al. 2003, Sung et al. 2012). De façon intéressante, des mutations du promoteur TERT sont observées dans 6% des nodules dysplasiques de bas grade et 19% de haut grade et la fréquence de ces mutations augmentent drastiquement au début du CHC (61%) puis devient stable au stade avancé de la maladie (Nault et al. 2014). De plus, le séquençage complet de CHC débutant et des lésions pré-malignes n'a révélé aucune mutation récurrente supplémentaire dans les gènes effecteurs classiques du CHC (Schulze et al. 2015) indiquant que les mutations du promoteur TERT se produisent très tôt et constituent un portail vers la transformation cellulaire. Il a également été rapporté que, les mutations du promoteur TERT sont fréquemment associées aux mutations de la β -caténine (CTNNB1) suggérant une coopération entre la maintenance de la télomérase et la voie de la β -caténine dans la tumorigenèse hépatique (Nault et al. 2013, Totoki et al. 2014 , Schulze et al. 2015).

b) La voie WNT/ β -caténine

La voie WNT/ β -caténine est essentielle dans l'embryogenèse, la zonation et le contrôle métabolique du foie. C'est également, la voie oncogénique la plus fréquente dans le CHC par des mutations activatrices de la CTNNB1 (11 à 37%) (de La Coste et al. 1998) et inhibitrices de AXIN1 (Axine 1) (5 à 15%) (Sato et al. 2000) ou de l'APC (1 à 2%). Les mutations CTNNB1 sont des substitutions ou des délétions de gènes localisés dans le domaine ciblé par le complexe inhibiteur APC/AXIN1/GSK3- β (de La Coste et al. 1998). Les mutations de β -caténine sont plus souvent retrouvées chez les patients non infectés par le VHB. Un niveau élevé de β -caténine dans le cytoplasme et dans le noyau a été observé dans environ 50% des tumeurs hépatiques; cela induirait un avantage prolifératif et inhiberait la différenciation cellulaire. Les souris transgéniques surexprimant la β -caténine ont une hépatomégalie sévère (Cadoret et al. 2001). Des études chez le patient ont aussi associé des mutations activatrices de la β -caténine aux CHC de mauvais pronostic, comme une taille de tumeur plus importante et une vascularisation augmentée (Behari et al. 2010). Les CHC comportant une voie β -caténine activée se retrouvent fréquemment chez des patients non cirrhotiques, en absence des facteurs de risques habituels. Bien que la contribution de la voie β -caténine au développement de CHC ne laisse guère de doute, le rôle précis dans la pathogénèse demeure encore non élucidé. L'inhibition pharmacologique de la β -caténine diminue la survie de cellules d'hépatome (Behari et al. 2007). L'inactivation d'APC induit l'apparition spontanée de tumeurs chez la souris (Colnot et al. 2004). Cependant, les souris exprimant un mutant gain de fonction de la β -

caténine (délétion de l'exon3) ne développent pas spontanément de tumeurs mais sont plus sensibles à la carcinogénèse induite par le DEN (Harada et al. 2002).

c) La voie p53/cycle cellulaire

Plus de la moitié des cancers humains présentent une altération de la voie p53 du cycle cellulaire, avec des mutations fréquentes du gène suppresseur de tumeur TP53 (12 à 48%) (Bressac et al. 1991, Hsu et al. 1991, Guichard et al. 2012, Fujimoto et al. 2015, Schulze et al. 2015). La protéine p53 est un facteur de transcription qui, en réponse à différents stress tels que des dommages à l'ADN, l'activation d'oncogènes ou l'hypoxie, est stabilisée. Cette stabilisation est médiée le plus souvent par des modifications post-traductionnelles, et p53 peut alors activer la transcription de ses gènes cibles impliqués dans différentes réponses anti-prolifératives (Zilfou et al. 2009). La protéine p53 peut activer la transcription en recrutant des modificateurs épigénétiques tels que des histones méthyl ou acétyl-transférases sur les promoteurs des gènes cibles. P53 active aussi la transcription en recrutant des facteurs du complexe de pré-initiation de la transcription comme TBP (« TATA binding protein »). Enfin, en fonction de plusieurs facteurs physiques et environnementaux, p53 activée, induira l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN ou la sénescence. Excepté la mutation R249S induite par une exposition à l'aflatoxine B1 (AFB1), aucune autre mutation de TP53 n'a été identifiée à ce jour (Fujimoto et al. 2012, Guichard et al. 2012). Dans les pays occidentaux où l'exposition à l'AFB1 est absente, seulement 20% des CHC présentent des mutations TP53 (Gouas et al. 2009). Ces mutations de p53 sont très fréquemment associées à une infection par le VHB et aucune mutation de TP53 n'est retrouvée dans les tumeurs bénignes.

Par ailleurs, l'inactivation d'autres acteurs du cycle cellulaire tels que la protéine du rétinoblastome (Rb) et la p21, est souvent observée dans les CHC (Ahn et al. 2014, Schulze et al. 2015). De plus, des insertions récurrentes du VHB dans les gènes de la cycline E1 (1,5%) (Sung et al. 2012) et une amplification du locus FGF19 de la cycline D1 (5 à 14%) (Sawey et al. 2011, Wang et al. 2013), ont été rapportées dans les CHC.

d) Le stress oxydatif

Comme évoqué précédemment (chapitre fibrose), le stress oxydatif joue un rôle clé dans les étapes précoces du CHC. Les mutations activatrices de Nrf2 [« Nuclear factor erythroid 2 (NF-

E2)-related factor 2 » codées par le gène NFE2L2] ou inhibitrices de Keap1 (« Kelch like ECH associated protein 1 »), empêchant l'ubiquitinylation de Nrf2 et sa dégradation physiologique via le protéasome, sont retrouvées dans 5 à 15% des CHC (Guichard et al. 2012 , Sporn et al. 2012). Les protéines Keap1 et Nrf2 sont deux composants importants dans la voie de survie cellulaire qui empêchent l'accumulation de facteurs cytotoxiques. Bien que Keap1 soit un répresseur de Nrf2 dans les cellules non stressées, lors de l'exposition à un stress oxydatif, Keap1 libère Nrf2 qui migre dans le noyau et active une multitude de gènes cytoprotecteurs. L'activation de la voie Nrf2 a précédemment été démontrée dans la protection des souris contre le stress oxydatif chronique et l'initiation tumorale (Sporn et al. 2012). En revanche, des mutations récurrentes identifiées dans le CHC, ont révélé l'activation de Nrf2 comme événement moteur dans la progression tumorale (Guichard et al. 2012 , Cleary et al. 2013). De plus, des études *in vitro*, montrent que l'activation de Nrf2 protège les cellules tumorales des ROS et de la mort (DeNicola et al. 2011).

e) Les régulateurs épigénétiques

Le CHC est associé à une altération récurrente des modificateurs épigénétiques (Schulze et al. 2015) avec des mutations inactivatrices d'ARID1A (4 à 17%) (Guichard et al. 2012) et ARID2 (3 à 18%) (Li et al. 2011) indiquant le rôle suppresseur de tumeur du complexe SW1/SNF (« Chromatin remodeling complexes »). Le rôle physiologique de ce complexe est d'assurer la modification de la structure de la chromatine et la position du nucléosome. Des altérations somatiques récurrentes de la famille des histones méthyl-transférases par mutations des gènes MLL (3 à 4%), MLL2 (2 à 3%), MLL3 (3 à 6%) et MLL4 (2 à 3%) ou par insertion dans le MLL4 (10%) par le VHB, sont fréquemment observées dans le CHC (Sung et al. 2012 , Cleary et al. 2013, Schulze et al. 2015). Dans un état physiologique, ces gènes codent pour des protéines qui modifient la méthylation des histones en ajoutant ou en supprimant le méthyle à l'histone H3K4. En effet, l'hypométhylation génomique augmente l'instabilité chromosomique, tandis que l'hyperméthylation localisée peut diminuer l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs et ainsi favoriser le développement de CHC. Ainsi, une hyperméthylation aberrante de gènes suppresseurs de tumeurs tels que RASSF1A (Ras association domain family member 1), APC, p73, Cadhérine E, et p16 est rapportée dans de nombreux CHC. Ce processus pourrait avoir lieu dès le stade pré-néoplasique (Yu et al. 2003, Yeo et al. 2005). De manière intéressante, il est rapporté que dans les CHC induits par le VHB, il existait une forte proportion

d'hyperméthylation des promoteurs des gènes p16 et E-cadhérine par rapport aux CHC non viro-induits (Wei et al. 2002).

Par ailleurs, la dérégulation de l'expression des micro-ARN a également été rapportée par différentes études suggérant que ces petits ARN non codants, qui régulent l'expression d'une multitude de gènes, pourraient être utilisés pour caractériser les tumeurs (Cullen 2004). En effet, les micro-ARN peuvent agir comme des oncogènes ou des suppresseurs de tumeur. Ainsi, l'équipe de Zucman-Rossi, a rapporté que toutes les tumeurs présentent une surexpression de miR-224 tandis que miR-96 est surexprimé uniquement dans les tumeurs VHB (Zucman-Rossi 2010). L'inhibition de l'expression de miR-107 et miR-375, est spécifiquement associée à des mutations dans les gènes HNF1- α et β -caténine respectivement (Zucman-Rossi 2010). Récemment, d'autres études ont rapporté que la dérégulation de l'expression des miR-122 (Coulouarn et al. 2009), miR-221 (Gramantieri et al. 2007), et miR-26 (Ji et al. 2009) est associée à des CHC de mauvais pronostic chez l'homme.

f) Les voies PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MAPK

Ces voies de signalisation sont activées dans environ 5 à 10% des CHC par une amplification du locus FGF19/Cycline D1 (Chiang et al. 2008, Li et al. 2011).

La voie PI3K/AKT/mTOR est activée par des facteurs de croissance tels que l'IGF et l'EGF (Avila et al. 2006). AKT peut phosphoryler mTOR (« mammalian Target of Rapamycin) et BAD (« BCL-2 associated death promoter »). L'activation de mTOR augmente la prolifération cellulaire, et l'inactivation de BAD augmente la survie (Roberts et al. 2005). Cette voie est négativement régulée par PTEN (« Phosphatase and tensin homolog »), qui est muté dans environ 5% des cas, et dont l'expression est réduite dans environ 50% des CHC (Hu et al. 2003). Une délétion homozygote de PTEN, a été identifiée dans 1 à 3% des CHC (Villanueva et al. 2008). De plus, une diminution de l'expression de PTEN corrèle avec des tumeurs plus avancées, et un mauvais pronostic (Villanueva et al. 2008). La phosphorylation d'AKT est impliquée dans la récurrence et un mauvais pronostic (Nakanishi et al. 2005). Enfin, la phosphorylation de mTOR est élevée dans 15% des CHC, et le niveau de p70 S6K (substrat de la forme phosphorylée de mTOR) est augmenté dans 45% des cas (Sahin et al. 2004).

Bien que les mutations activatrices des gènes de la famille RAS soient très rarement observées dans les CHC (<2%), les mutations inhibitrices de RPS6KA3 codant pour RSK2, un inhibiteur de RAS, ont été identifiées dans 2 à 9% des tumeurs (Guichard et al. 2012). RSK2, est situé en

aval de MAPKK et d'ERK, et assure une boucle de contrôle négative de la signalisation RAS (Douville et al. 1997). Ainsi, l'inactivation de RSK2 empêche le rétrocontrôle négatif provoquant une activation constitutive de la voie (Schulze et al. 2015). Plusieurs données expérimentales suggèrent également que l'activation persistante de RAS peut être un mécanisme de résistance des CHC au Sorafenib (Rudalska et al. 2014).

Les MAPKs sont des serines-thréonines kinases impliquées dans de multiples activités cellulaires. Elles sont constituées de trois membres majeurs, ERK, JNK, et p38. Ces trois membres ont pu être impliqués dans le développement de CHC, via leur effet sur la prolifération et la survie cellulaire.

La voie ERK est ubiquitaire et peut être activée par plusieurs récepteurs, en particulier les récepteurs à tyrosine kinase tels que l'EGFR. Il a été montré que le niveau de phosphorylation d'ERK est plus élevé dans le tissu tumoral que dans le tissu non tumoral, et que son activation est associée à un phénotype agressif de la tumeur (Schmitz et al. 2008). De plus, des régulateurs négatifs de la voie ERK, comme Sprouty et DUSP1 sont sous-exprimés dans les CHC (Yoshida et al. 2006, Calvisi et al. 2008). L'activation constitutive d'ERK peut aussi avoir lieu suite à des mutations ponctuelles dans le gène RAS, dans environ 10 à 30% des CHC (Whittaker et al. 2010). Un inhibiteur de la voie ERK, l'AZD6244 possède un effet inhibiteur de la prolifération et inducteur de l'apoptose sur des cellules primaires de CHC, ainsi que dans un modèle de xénogreffe (Huynh et al. 2007, Huynh et al. 2007). L'action anti-tumorale de l'inhibiteur d'ERK passe par une augmentation de l'expression de gènes pro-apoptotiques comme les caspases 3 et 7 et une diminution de l'expression de la cycline D1.

La seconde MAPK impliquée dans la tumorigenèse est JNK. Les deux membres JNK1 et JNK2 régulent l'apoptose et la prolifération. JNK1 est suractivé dans les tumeurs par rapport au tissu non tumoral adjacent et cette activation serait associée à une taille de tumeur augmentée et l'absence d'encapsulation (Chang et al. 2009). Les modèles génétiques d'inactivation de JNK1 ou 2 ont permis de mieux définir le rôle précis de chacun dans la carcinogenèse hépatique. Ainsi, seules les souris KO pour JNK1 présentent un développement tumoral diminué après induction par du DEN (Sakurai et al. 2006, Hui et al. 2008).

Enfin, la troisième MAPK, p38 est activée par MKK3, 4 et 6. Ses substrats incluent p53, MK2 et MK5 (« MAPK-activated protein kinase » ou MAPKK). De manière intéressante, son activation est plutôt anti-proliférative et donc inhibitrice du développement de CHC. En effet, p38 régule négativement la voie JNK, connue pour son activité pro-proliférative dans les

cellules transformées. Les souris KO pour p38 présentent une tumorigenèse accrue après traitement par du DEN (Hui et al. 2007 , Hui et al. 2007 , Sakurai et al. 2008).

2- Classification moléculaire du CHC

Afin de fournir une meilleure compréhension moléculaire des différents événements biologiques (décrits précédemment) qui influencent les types de tumeurs et de déterminer des biomarqueurs ou cibles spécifiques pour les thérapies, différentes équipes ont effectué une classification moléculaire des CHC. Le fait est que, bien qu'elles soient au même stade clinique, les tumeurs sont significativement différentes au niveau moléculaire. Il est important de prendre en compte cette caractéristique afin de proposer au patient une thérapie adaptée. Par exemple, la détermination de signatures géniques dans le cancer du sein, a permis d'identifier des patientes qui pourraient bénéficier d'une chimiothérapie adjuvante après résection (van de Vijver et al. 2002). Différentes classifications des CHC ont été rapportées dans la littérature. L'une des premières fut celle de l'équipe de Zucman-Rossi qui par une approche transcriptomique, a défini six groupes de CHC nommés de G1 à G6 en tenant compte du niveau de stabilité chromosomique dans les tumeurs. En effet, Les tumeurs de G1 à G3 sont plus chromosomiquement instables par rapport à celles des groupes G4 à G6. De plus, Les tumeurs de G1 présentent un nombre faible de copies VHB avec une surexpression de marqueurs de foie fétal. Les G2 sont des tumeurs avec un nombre élevé de copies VHB et des mutations PIK3CA et TP53. Les tumeurs de G3 présentent des mutations TP53 sans infection HBV avec une méthylation fréquente de la protéine p16 et une surexpression des gènes contrôlant le cycle cellulaire. Le groupe G4 regroupe les adénomes et les carcinomes avec une mutation TCF1. Enfin, les groupes G5 à G6 sont principalement composés de tumeurs avec des mutations β -caténine (Zucman-Rossi 2010). D'autres études comme celle de l'équipe de Golub, également par une approche transcriptomique, a rapporté 3 classes de CHC nommées S1, S2 et S3. Les S1 se caractérisent par une activation aberrante de la voie WNT/ β -caténine, les S2 par une prolifération et une activation de Myc et d'AKT et les S3 par des hépatocytes différenciés (Hoshida et al. 2009).

De façon intéressante, malgré le fait que les marqueurs génomiques définissant les différentes sous-classes soient différents selon les études, l'analyse intégrative a montré que la majorité d'entre elles ont des signaux génomiques identiques (Villanueva et al. 2011). Suite à une étude cumulée des différentes classifications, l'équipe de Zucman-Rossi a rapporté récemment une

	PROLIFERATION CLASS		NON-PROLIFERATION CLASS	
CELL LINEAGE FEATURES	Progenitor-like	Hepatocyte-like	Hepatocyte-like	
PROGNOSTIC GENE SIGNATURES	EpCAM S2 Hepatoblastoma-C2 Hepatoblast-like Cluster A Vascular invasion signature G1-3 / 5-gene signature	Late TGF- β S1	S3 Cluster B WNT / CTNNB1 G5-6	Poly 7 Immune related
DNA SOMATIC ALTERATIONS	Chr 11q13 amplif. (FGF19 / CCND1)		CTNNB1 mut.	DNA ampl. Chr7
SIGNALING PATHWAY ACTIVATION	NOTCH IGF2 RAS / MAPK MET AKT / MTOR	TGF β Liver-WNT	Classical WNT	
EPIGENETIC-BASED SUBTYPES	36 CpG DNA methylation signature miRNA Class C3	miRNA Class C2 (C19MC)	miRNA Class B	
CLINICAL FEATURES	HBV High AFP levels Poor differentiation Vascular invasion (+++)		HCV, Alcohol Low AFP levels Well-Mod differentiation Vascular invasion (+) Better outcome	
	Worse outcome (recurrence / survival)			

Tiré de la revue de Jessica Zucman-Rossi et collaborateurs, *Gastroenterology*, 2015.

Figure 10 : Résumé de la classification moléculaire du CHC. Les classes majeures (prolifératif et nonprolifératif) sont représentées selon leur profil transcriptomique et des caractéristiques moléculaires additionnelles affectant la structure de l'ADN, la dérégulation de voies de signalisation et l'épigénétique.

classification des CHC, basée sur le pouvoir prolifératif de la tumeur. Ainsi, les CHC se subdiviseraient grossièrement en deux classes moléculaires majeures (Hoshida et al. 2009) : les CHC « Prolifératifs » et les « Non-prolifératifs » (Fig. 10).

a) Les CHC prolifératifs

Cette classe qui représente environ 50% des patients, se caractérise par une activation importante des voies de signalisations impliquées dans la prolifération/survie cellulaire, une augmentation des marqueurs de mauvais pronostic associée à un phénotype agressif et à des échecs thérapeutiques. De façon intéressante, les tumeurs de cette classe expriment beaucoup plus, des marqueurs de cellules progénitrices comme EpCam (Yamashita et al. 2008 , Yamashita et al. 2013) ou « Hepatoblastoma-like » (Lee et al. 2006). Le type cellulaire à l'origine de CHC dans cette classe, est assez controversé (Holczbauer et al. 2013). Ainsi on peut identifier des hépatoblastomes, qui sont des tumeurs embryonnaires rares, mais qui représentent le cancer primaire du foie le plus fréquent chez l'enfant âgé de moins de trois ans. Les hépatoblastomes proviennent de cellule précurseur du foie, les hépatoblastes. Les cholangiocarcinomes, proviennent eux des cholangiocytes (Cairo et al. 2008 , Sia et al. 2013). L'hétérogénéité de cette classe peut s'expliquer par des facteurs tels que le taux élevé d'instabilité chromosomique ou un enrichissement de changements épigénétiques anormaux. Par exemple, un niveau élevé d'amplification d'ADN du chromosome 11q13 (locus FGF19, cycline D1), est très fréquent dans cette classe (Villanueva et al. 2015).

Sur le plan clinique, les patients appartenant à cette classe, ont des tumeurs agressives, peu différenciées, avec des taux élevés d'AFP (Chiang et al. 2008 , Villanueva et al. 2011), un risque élevé de récurrence après résection et un taux de survie faible (Lee et al. 2004, Villanueva et al. 2011). Les CHC liés au VHB appartiennent majoritairement à cette classe.

b) Les CHC non prolifératifs

Cette classe présente deux caractéristiques majeures : une activation dominante de la voie WNT (jusqu'à 25% des cas), une réponse immunitaire et un transcriptôme similaire à celui des hépatocytes en condition physiologique. Cette classe est marquée par une expression élevée des marqueurs tels que GLUL ou LGR5 (Boyault et al. 2007), des gains géniques dans le chromosome 7 associés à une surexpression du récepteur à l'EGF et une prédominance masculine (Keng et al. 2013). Du point de vue clinique, les tumeurs de cette classe présentent

un phénotype moins agressif, une meilleure différenciation histologique, une diminution de l'AFP et ne sont pas de mauvais pronostic. Les CHC liés au VHC et à l'alcool sont plus fréquents dans cette classe.

Ainsi, par cette nouvelle classification des CHC, nous pouvons remarquer que les CHC des groupes G1 à G3, chromosomiquement instables, sont des CHC prolifératifs alors que les G5 à G6 ne le sont pas, ce qui peut expliquer qu'ils aient une instabilité chromosomique moindre.

L'un des points faibles de cette classification des CHC, est qu'elle repose uniquement sur le profil d'expression des gènes. Des approches plus récentes visent à améliorer ce classement en combinant les aspects génétiques et les aspects épigénétiques des tumeurs (Ciriello et al. 2013). Il est cependant, important de noter que les classifications proposées par les différentes équipes révèlent que l'instabilité génétique et/ou chromosomique est un acteur majeur du développement et de la progression du CHC.

PARTIE 2 : Le Virus de l'Hépatite B

L'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) représente la première cause d'hépatite virale dans le monde. Environ 45% de la population mondiale vivent en zone d'endémie (Jury 2003) avec environ 12% et 75% de personnes infectées respectivement en Afrique et en Asie. Des marqueurs sériques de contact avec le VHB, ont été retrouvés chez 35 à 62% de la population chinoise, 56 à 98% de la population d'Afrique sub-saharienne, 82% de la population mélanésienne de Fidji et 69% de la population de Nauru (île du Pacifique) (Gish et al. 2015). Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), 240 millions de personnes sont chroniquement infectées par le VHB (Ott et al. 2012) avec un risque élevé de développer une maladie hépatique sévère.

I- Origine et découverte

L'origine virale de cette hépatite n'a été pressentie qu'en 1965 quand Baruch S. Blumberg, Harvey J. Alter et Sam Vinish ont découvert dans le sang d'un aborigène Australien, un antigène inconnu qui réagit avec le sérum d'un individu américain polytransfusé (Blumberg et al. 1965). La présence de cet antigène, appelé antigène Australia, sera ensuite lié à l'hépatite dès 1967 (Bayer et al. 1968, Blumberg et al. 1969, Levene et al. 1969). La particule virale sera ensuite décrite par Dane et coll. en 1970 qui observe par microscopie électronique dans le sérum de trois malades, des particules agglutinées par un anticorps spécifique de l'antigène Australia (antigène qui n'est autre que la protéine d'enveloppe AgHBs) (Fig. 11A). La nature virale de ces particules sera confirmée en 1973 par la détection d'une activité ADN polymérase endogène au sein de la particule de Dane, particule infectieuse du VHB (Kaplan et al. 1973).

A) Phylogénie

1- Classification

Caractérisé par un génome d'ADN circulaire, partiellement double brin et utilisant une ADN polymérase ARN-dépendante (transcriptase inverse) et ADN-dépendante associée à une RNaseH dans son cycle de répllication virale, le VHB appartient à la famille des *Hepadnaviridae* (pour Hepatotropic DNA virus) (Fig. 11B). Le VHB est le 1^{er} membre de sa famille à avoir été

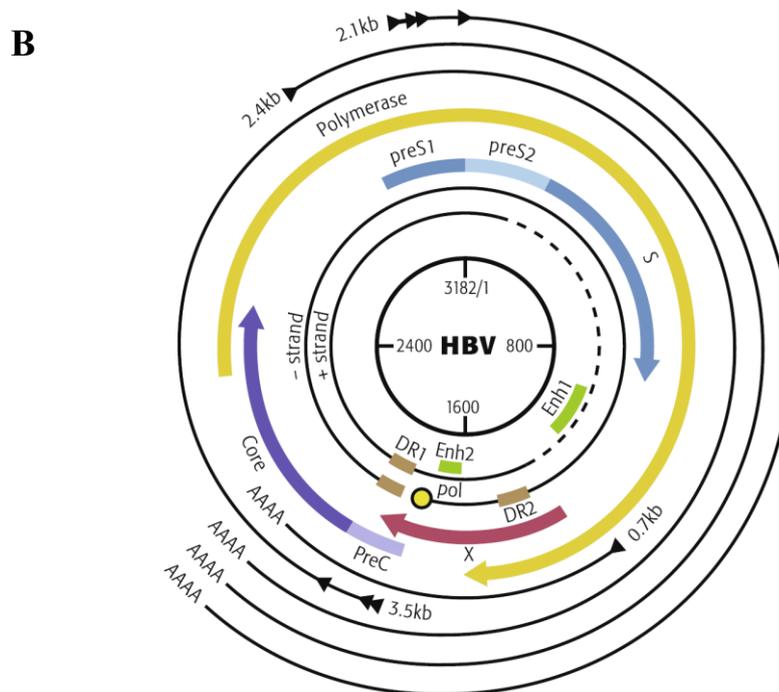
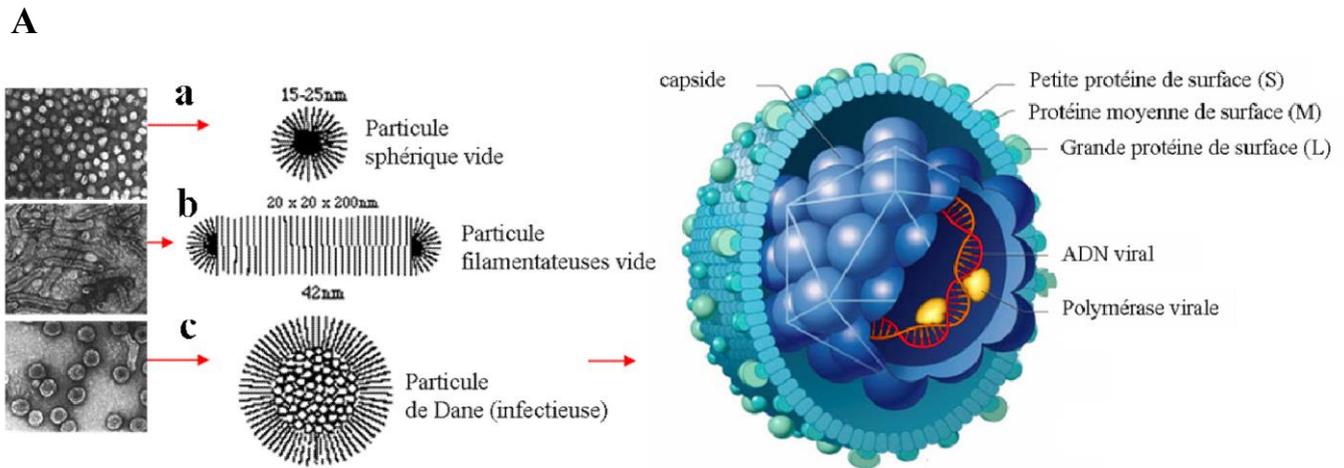


Figure 11 : Virus de l'hépatite B (VHB). (A) Images de microscopie électronique et organisation de la particule du VHB. (B) Structure génétique du VHB.

découvert. La famille des *Hepadnaviridae* est composée du i) genre orthohépadnavirus infectant les mammifères, comprenant 9 membres dont le VHB et le WHV (« Woodchuck Hepatitis Virus », infectant la marmotte) (Summers et al. 1978) et ii) le genre avihépadnavirus infectant les oiseaux, comprenant 6 membres dont le DHBV (« Duck Hepatitis B Virus », infectant le canard) (Mason et al. 1980). Leur organisation génétique est commune, ainsi que leur cycle répliatif, même si quelques différences entre orthohépadnavirus et avihépadnavirus peuvent être notées : l'ADN génomique du DHBV est presque entièrement double brin, contrairement au génome des orthohépadnavirus qui l'est partiellement. De plus, le génome des orthohépadnavirus code pour trois types de protéines d'enveloppe (PréS1, PréS2 et S), alors que le génome des avihépadnavirus ne code que deux protéines d'enveloppe (PréS et S). Enfin, les génomes des virus aviaires ne comportent pas de région X, bien qu'une phase ouverte de lecture codant pour une protéine « *X-like* » non essentielle ait été décrite chez le DHBV (Chang et al. 2001). Chaque virus présente une spécificité d'hôte, mais peut infecter des animaux phylogénétiquement proches.

2- Sérotypes et génotypes

Suite à la découverte de l'antigène Australia, il est devenu évident que les sérums de patients ayant subi une séroconversion (contenant des anticorps anti-HBs) réagissaient différemment contre l'antigène HBs (AgHBs) de différents porteurs chroniques. L'hypothèse d'une variabilité antigénique a donc permis d'établir un système de classification en fonction du sérotype c'est-à-dire de la réactivité de l'AgHBs de l'isolat contre un panel standard d'anti-sérums (Bouvier et al. 1975, Courouge et al. 1983).

Trois déterminants antigéniques majeurs ont été déterminés :

- Le déterminant « *a* », contenu dans la région immuno-dominante de l'AgHBs entre les résidus 124 et 147, est commun à toutes les souches du VHB.
- Les couples de déterminants « *d/y* » et « *r/w* » sont les plus importants pour la classification des sous-types viraux du VHB. En effet, ces deux paires de déterminants sont mutuellement exclusifs et dépendent respectivement de la nature de l'acide aminé en position 122 et 160. Ainsi, si l'acide aminé en position 122 est une arginine (122R), le sous-type est « *y* » et si c'est une lysine (122K), le sous type est « *d* ». De la même façon, 160R définit le sous-type « *r* » et 160K le sous type « *w* » (Okamoto H et coll. 1987). D'autres déterminants mineurs localisés aux positions 127, 144, 145, 158, 159,

Genotypes	Sub-genotypes
A: Eastern Europe (Poland, Czech Republic, Bulgaria, Hungary), Central Europe (Spain, Italy), Central Africa, Morocco, India, Guadalajara, Jalisco, Gambia, Nigeria, Haiti, Congo, Rwanda, Cameroon, Japan, Philippines, USA, Canada, Mexico, Argentina, Brazil	A1 Southern and Eastern Africa, India, Brazil, Philippines A2 South Africa, Bulgaria, Brazil, Morocco A4–7 Gambia, Nigeria, Haiti, Congo, Rwanda, Cameroon
B: China, Indonesia, Latin America (Asian immigrants), Vietnam, Taiwan, Hong Kong, Philippines, Thailand, Canada	B2 Southern China, Taiwan B3 Indonesia B5 Taiwan, Philippines B7 Indonesia B2–5 Vietnam
C: China, Indonesia, Vietnam, Latin America (Asian immigrants), South Korea, Hong Kong, Japan, Philippines, India, Thailand, Canada, Australia	C1 China Indonesia, Japan, Thailand C2 China, Japan, Thailand C3 Japan, Thailand C4 Thailand, Australia C5 Philippines, Thailand C5–16 Vietnam
D: Saudi Arabia, Southeastern Europe, India, Russia, Baltic region, Belarus, Romania, Hungary, Serbia, Croatia, Lithuania, Romania, Bulgaria, Central Europe (Italy, Spain), Tunisia, Canada, Central and Southern Africa, Iran, Mongolia, Pakistan, Australia	D1 Northern Africa, Persian Gulf (Iran, Syria, Turkey), India, Pakistan, Saudi Arabia D2, D3, D4, D9 India, Turkey D3 South Africa D4 Central Africa, Australia D7 Northern Africa
E: Western Africa, Central Africa, Saudi Arabia	C1 Southern China, India C2 Northern China
D: Guadalajara, Jalisco, Mexico, Argentina, Turkey, USA	D1 Bulgaria D2 Albania, Russia, Estonia, Siberia, Eastern Russia D3 Serbia
F: Latin America (Brazil, Argentina), Tunisia, Spain	F1 Central America, Eastern South America F2 Venezuela, Brazil (F2a) F3 Panama, Colombia, Venezuela F4 Bolivia, Argentina, Brazil
H: Amerindians and Mestizos in Mexico, USA	–
G: USA, Canada	–
I: Vietnam, Canada, Laos, India, China	–
J: Japan, Ryukyu	–
Recombinant A/D and A/E: Africa	–
Recombinant C/D1–CD2: Western China	–

Tiré de la revue de Nannini Pilar et Sokal Etienne M., Archives of Disease in Childhood 2016.

Table 1 : Répartition des génotypes et sous-génotypes du VHB dans le monde.

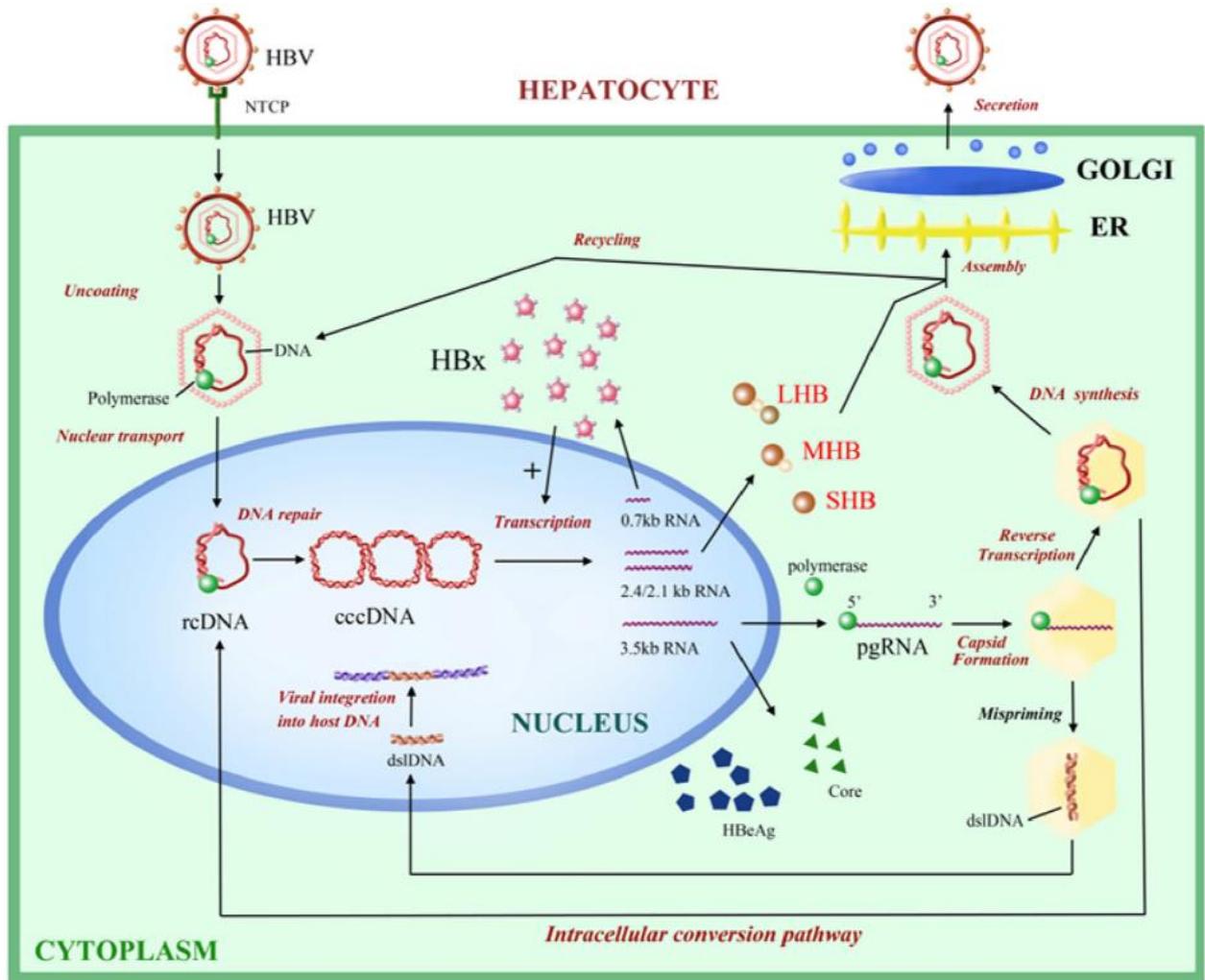
177 et 178 ont été identifiés et, au total, 9 sérotypes différents ont été définis : *ayw1* à *4*, *ayr*, *adw2*, *adw4*, *adrq-* et *adrq+*.

Avec l'arrivée du séquençage, une nouvelle classification basée sur la comparaison des séquences nucléotidiques des différentes souches du VHB, a vu le jour. Cette classification fait actuellement état de 10 génotypes nommés de A à J. Une concordance partielle et non systématique existe cependant entre les classifications sérotype/génotype. La définition d'un nouveau génotype est liée à une divergence d'au moins 8 % de la séquence nucléotidique dans tout le génome, ou d'au moins 4,1 % dans le gène de surface (Halfon et al. 2002). La répartition géographique mondiale des différents génotypes n'est pas homogène (Table 1). De plus, les mouvements de populations qui tendent à s'accroître, favorisent les mélanges de génotypes. La coexistence de différentes souches dans un même lieu est à l'origine des phénomènes de surinfection qui conduisent à des recombinaisons entre génotypes.

B) Tropisme et mode de transmission

Comme tous les *Hepadnaviridae*, le VHB infecte et se réplique principalement dans les hépatocytes. De faibles quantités de VHB ont cependant, été détectées dans le pancréas, les reins, la peau, les spermatozoïdes et les PBMC (« Peripheral blood mononuclear cells ») (Pontisso et al. 1984, Pasquinelli et al. 1986, Lieberman et al. 1987). Les formes de répllication du VHB, habituellement non détectées dans les cellules non hépatocytaires, ont été trouvées dans des cellules mononucléées activées du sang chez la marmotte (Korba et al. 1989) ou *in vitro* dans des cellules mononucléaires U937 (Muller et al. 1992). Enfin des transcrits du VHB ont été détectés dans des cellules mononucléées du sang de patients infectés (Feray et al. 1990). Ces cellules pourraient jouer un rôle de réservoir viral et expliquer l'échec de la thérapie par transplantation hépatique chez certains patients.

Chez l'homme, le VHB est retrouvé dans le sang sous forme libre ($\sim 10^{13}$ copies/ml) mais également en quantités moins importantes dans la salive et les sécrétions (sperme, sécrétions vaginales, selles et urines) ($\sim 10^5$ copies/ml). De cette répartition dans les liquides biologiques, découlent les différents modes de contamination (Scott et al. 1980). Le VHB se transmet essentiellement par voie sexuelle, par voie parentérale avec un contact direct ou indirect avec du sang infecté mais dans les régions de forte endémie, la transmission se fait principalement par voies materno-fœtale et périnatale.



Tiré de la revue de Wang Ming et collaborateurs, *Hepatology International*. 2017.

Figure 12 : Schéma du cycle de réplication du VHB.

II- Biologie moléculaire du VHB

A) Structure et particules sous-virales

Les virions du VHB sont des particules à double coque, de 40 à 42 nm de diamètre (particule de Dane), avec une enveloppe de lipoprotéines externe contenant trois glycoprotéines d'enveloppe apparentées (antigènes de surface) (Dane et al. 1970, Ganem 1991). Dans l'enveloppe se trouve la nucléocapside virale (Protéine Core) constituée d'homodimères de la protéine « Core » ou HBc, reliés par un pont disulfure à la cystéine 61. Ces homodimères peuvent s'assembler sous deux formes icosaédriques, une forme de 30 nm de diamètre composée de 90 dimères, et une forme de 34 nm composée de 120 dimères, forme aboutissant préférentiellement au virion infectieux (Wynne et al. 1999, Patient et al. 2009). A l'intérieur de la nucléocapside se trouve le génome du VHB auquel est liée de façon covalente la polymérase virale. De plus, plusieurs protéines d'origine cellulaire telles des chaperonnes (Hsp70, Hsp90, p23) et une protéine kinase de type C (PKC) ont pu être identifiées à l'intérieur de la particule de Dane (Kann et al. 1993). En plus des virions, les cellules infectées par le VHB produisent deux particules sous-virales distinctes : des formes sphériques de 20-22 nm et des formes filamenteuses de diamètre similaire mais de longueur variable. Les particules sous-virales résultent de l'assemblage des protéines d'enveloppe et ne sont pas infectieuses. Elles sont cependant, sécrétées en large excès par rapport aux particules infectieuses (jusqu'à environ 10^{13} équivalents génomes par mL de sérum chez un patient infecté) et elles joueraient un rôle dans la persistance de l'infection virale en saturant le système immunitaire de l'hôte (Ganem 1991) (Fig. 11A).

B) Le cycle de réplication du VHB et organisation génétique

1- Cycle de réplication du VHB

a) *Attachement et entrée*

Le cycle de réplication du VHB commence par la fixation et l'entrée dans les hépatocytes (Fig. 12). Le VHB s'attache initialement via des interactions de faible spécificité entre l'AgHBs de l'enveloppe virale et les héparanes sulfates des protéoglycanes à la surface des hépatocytes (Schulze et al. 2007, Le Duff et al. 2009). L'établissement d'interactions électrostatiques avec deux résidus hautement conservés chargés positivement, R122 (Arginine 122) et K141 (Lysine

141), dans la région de la boucle antigénique de l'AgHBs (Sureau et al. 2013), est ensuite stabilisé par une interaction de spécificité plus élevée entre les 75 acides aminés en N-terminal du domaine préS1 (large protéine d'enveloppe) et le NTCP (« Sodium Taurocholate Co-transporting Polypeptide »), un transporteur de sel biliaire spécifique aux hépatocytes (Yan et al. 2012, Ni et al. 2014). Le récepteur NTCP est composé de deux séquences motifs (Yan et al. 2012), l'une nécessaire à l'interaction avec le VHB et contenant les acides aminés 157-163, l'autre à l'infection composée des acides aminés 84-87 (Yan et al. 2013). Il a été rapporté dans la souris, que l'absence des acides aminés 84-87 dans le NTCP, expliquerait la résistance à l'infection par le VHB (Elinger 2014, Ni et al. 2014). Bien que la découverte du NTCP comme l'un des récepteurs d'entrée du VHB ait été une avancée majeure pour l'étude des mécanismes d'entrée du VHB, différents rapports indiquent que le NTCP ne serait pas le seul responsable de l'entrée du VHB.

Lié à la membrane des hépatocytes, le VHB entre alors dans la cellule par endocytose. Cette endocytose serait médiée par des facteurs cellulaires tels que la cavéoline 1, la chaîne lourde de la clathrine et la protéine AP-2 (« Clathrin adaptor protein ») (Macovei et al. 2010, Huang et al. 2012).

b) Transport et libération du génome

Une fois dans le cytoplasme, l'interaction du virion avec les compartiments endosomaux médiée par les protéines Rab5 et 7 (Macovei et al. 2013), induit un clivage protéolytique des composants de l'enveloppe libérant ainsi la capside. Cette dernière contenant le génome viral, formé d'une molécule d'ADN circulaire relâché (ADNrc), est transportée vers le noyau par le réseau des microtubules (Rabe et al. 2006) et via un signal de localisation nucléaire (NLS) (Blondot et al. 2016). Ces NLS situés dans la région C-terminale de la protéine Core sont démasqués à la suite de changements conformationnels. Ainsi la localisation des capsides au niveau du complexe du pore nucléaire (CPN) a été décrite par l'équipe de Kann (Pante et al. 2002). Les CPN sont constitués d'un assemblage symétrique de trente protéines différentes, les nucléoporines (Nups). L'interaction entre les capsides et les importines α et β , provoque le transport dans le « Nuclear basket ». Ce complexe d'import s'associe à Nup153 notamment par les protéines de capside, et s'ensuit le désassemblage des nucléocapsides. Plusieurs indices stipulent que le désassemblage de la capside et la libération du génome viral, a lieu principalement dans le « Nuclear basket » des CPN. L'étape finale de la migration nucléaire du génome du VHB serait potentialisée par le NLS de la polymérase virale (Lupberger et al. 2013).

c) Formation et transcription de l'ADNccc

Une fois dans le noyau, le virus utiliserait des facteurs de la cellule hôte notamment les protéines de réparation de l'ADN telles que TDP2 et la Pol-K pour convertir son ADNrc (ADN circulaire, relâché et partiellement double brin) en ADNccc (ADN circulaire, covalamment clos et double brin) (Koniger et al. 2014, Qi et al. 2016). L'ADNccc est compacté sous forme de minichromosome dans le noyau de la cellule hôte par l'interaction entre les protéines histone (H1, H2A, H3 et H4) et les non histones (Bock et al. 2001). Une fois établi, l'ADNccc est très stable, avec une demi-vie d'au moins 33 à 57 jours, selon les estimations chez le VHB du canard (Addison et al. 2002).

La transcription de l'ADNccc nécessite la machinerie cellulaire (ARN pol II) pour transcrire tous les ARNs viraux indispensables à la production de l'ensemble des protéines du virus et à la formation de nouveaux virions. Des protéines virales (HBx, HBc) et cellulaires (facteurs de transcription C/EBP et HNF) interviennent dans ce processus. De même, CREB, ATF, STAT1, STAT2 et des enzymes d'acétylation ou de méthylation de la chromatine peuvent se fixer à l'ADNccc (Pollicino et al. 2006, Belloni et al. 2009, Levrero et al. 2009). Par ailleurs, la protéine HBx du VHB, jouerait un rôle crucial dans la régulation transcriptionnelle et épigénétique de l'ADNccc (Lucifora et al. 2011, Riviere et al. 2015, Decorsiere et al. 2016).

Bien que les sites d'initiation de la transcription diffèrent entre les transcrits viraux, tous exploitent le même site de polyadénylation :

- Les ARN pré-génomiques (ARNpg) de 3,5 kb, contiennent par définition l'intégralité de l'information génétique, ainsi qu'une région redondante aux extrémités 5' et 3'. Pour cette raison, leur taille est supérieure à celle du génome viral circulaire entier. Ces ARNm constituent une famille d'ARN polycistroniques. On distingue deux sortes de transcrits génomiques qui diffèrent légèrement par leur extrémité 5' : i) l'ARNm préC, le plus long, qui débute en amont du codon d'initiation de la traduction de la région préC. Bien que polycistronique, ce transcrit code pour une unique protéine virale, la protéine pré-Core, précurseur de l'antigène HBc; ii) l'ARNm C légèrement plus court débute en aval du codon d'initiation de la région préC et en amont de celui du gène C. D'une part, ce transcrit est bicistronique : il code pour la protéine de capsidite et la polymérase virale, d'autre part, il sert de matrice pour l'étape de transcription inverse.
- Les ARNm subgénomiques de 2,4 et 2,1 kb sont polycistroniques et permettent la synthèse de 3 protéines d'enveloppe du VHB. L'extrémité 5' du transcrit de 2,4 kb, ou

ARNm préS1, est située en amont du codon d'initiation de la traduction de la région préS1. Ce transcrit code pour la grande protéine d'enveloppe L. L'extrémité 5' des ARNm de 2,1 kb est hétérogène. En effet ceux-ci débutent en aval du codon d'initiation préS1 et en amont ou aval du codon d'initiation de la région préS2. Le transcrit le plus long, l'ARNm préS2, permet la traduction des protéines d'enveloppe M et S tandis que le plus court, l'ARNm S, assure uniquement la synthèse de la protéine S.

- L'ARNm subgénomique de 0,7 kb, le plus court des transcrits viraux, est monocistronique. Il permet la synthèse de la protéine HBx.

Outre les ARNm viraux non épissés (majoritaires), des transcrits épissés minoritaires issus de l'ARN de 3,5 kb ont été décrits dans des tissus infectés ou des lignées cellulaires d'hépatome humain transfectées (Gunther et al. 1997).

d) Encapsidation et transcription inverse

L'encapsidation est induite par la formation du complexe ribonucléo-protéique ARNpg/Polymérase virale (« RNP »). La région redondante présente aux extrémités 5' et 3' de l'ARNpg contient une séquence de 60 nucléotides correspondant au signal d'encapsidation epsilon « ϵ » et localisée dans la partie 3' de la région PréC. La région « ϵ » sert aussi d'origine de répllication pour la synthèse du brin négatif. Lors de la reverse transcription, la polymérase a 3 fonctions distinctes : i) la synthèse d'amorce, ii) une polymérisation de l'ADN ARN/ADN dépendante et iii) une dégradation de l'ARN médiée par la ribonucléase H (RNaseH). Suite à la fixation en 5' de la région « ϵ » de l'ARNpg, la polymérase synthétise 3 oligonucléotides GAA utilisant la région « ϵ » comme matrice. Cette amorce de 3 nucléotides est covalamment liée à la polymérase et le complexe transloque ensuite dans la région DR1 (« Direct repeat 1 ») située en 3'. En utilisant cette amorce et l'ARNpg comme matrice, la Pol synthétise le brin négatif tout en dégradant simultanément la matrice d'ARN grâce à son activité RNaseH. Dès lors que, la polymérase est fixée de façon stable à l'extrémité 5' du brin négatif néosynthétisé, une boucle se forme. Les 18 derniers nucléotides en 5' de l'ARNpg épargnés de la dégradation, servent ensuite d'amorce pour la synthèse du brin positif. Dans environ 90% des nucléocapsides, l'amorce de 18 nucléotides d'ARNpg transloque dans la région DR2 conduisant à la synthèse de l'ADNrc. Dans 10% des cas, l'amorce d'ARN reste liée à la région DR1, amorçant la synthèse d'ADN linéaire bicaténaire (ADNds1). Une petite minorité des capsides matures contenant l'ADNrc, va être recyclée vers le noyau pour augmenter ou

maintenir le pool d'ADNccc et une grande majorité va être dirigée vers le réticulum endoplasmique (RE) où les nucléocapsides sont enveloppées.

e) Morphogenèse

Le bourgeonnement de la nucléocapside du VHB dépend principalement de la grande protéine L d'enveloppe (Bruss et al. 1995). Les MVB (« Multi vesicular bodies ») sont habituellement impliqués dans le tri et la dégradation via le protéasome, des protéines malformées (Slagsvold et al. 2006). Cette machinerie regroupe au moins 3 complexes protéiques requis pour le transport : ESCRT-I, II et III. Ces complexes sont recrutés et assemblés séquentiellement vers le côté cytosolique de la membrane de l'endosome tardive pour générer des MVB par de multiples invaginations. Ce mécanisme de tri protéique ferait intervenir l'ATPase Vps4. Différentes études ont montré que, contrairement aux particules sous-virales, les particules infectieuses du VHB utiliseraient la machinerie cellulaire des MVB par interaction entre la protéine Core du VHB et les complexes ubiquitine ligase Nedd4 et le « ubiquitin-interacting adaptor γ -adaptin » (Hartmann-Stuhler et al. 2001, Rost et al. 2006). De plus, les complexes ESCRT, Vsp4A/B et Alix/AIP1 colocaliseraient avec les protéines Core et L et l'expression de dominants négatifs régulerait négativement la sécrétion des particules infectieuses. Ces données sont en accord avec un bourgeonnement des particules matures dans les endosomes tardifs ou MVB et une sortie de la cellule par exocytose, bien que le rôle précis du système ESCRT ne soit pas encore totalement élucidé (Patient et al. 2009).

f) Epissage alternatif du VHB

Bien que l'épissage ne soit pas essentiel à la réplication du VHB *in vitro*, au cours du cycle de réplication du VHB, et notamment durant de la phase de transcription, l'ARN de 3,5 kb du VHB peut être épissé (Su et al. 1989). Plus d'une douzaine de variants dérivés de l'épissage ont été identifiés (Gunther et al. 1997) et les plus courantes sont les variants simples ou doublement épissés de 2,2 kb. Le variant simple épissé de 2,2 kb présente une délétion de 1,2 kb entre l'extrémité 3' du gène Core et le milieu de la région S, empêchant l'expression de la protéine Pol complète. Les 46 résidus en N-terminal de la protéine Pol fusionnent alors avec 47 résidus codés par un cadre de lecture différent pour générer une petite protéine épissée de 12,4 kDa nommée HBSP ou « Hepatitis B Spliced Protein », composée de 93 à 113 acides aminés selon le génotype viral (Soussan et al. 2000). L'épissage alternatif de l'ARN de 3,5 kb du VHB peut

également conduire à la formation d'ARNpg épissés, qui après encapsidation, peuvent aboutir à la sécrétion de particules virales défectives. Les virions hébergeant ce génome viral raccourci, peuvent en fait circuler dans le sang des porteurs chroniques de VHB, mais pas dans d'une infection aiguë VHB (Rosmorduc et al. 1995, Gunther et al. 1997). De plus, une augmentation sérique du ratio de variants VHB épissés et de VHB de type sauvage est en corrélation avec la fibrose hépatique et le carcinome hépatocellulaire (Soussan et al. 2008, Bayliss et al. 2013). Des études *in vitro* suggèrent que HBSP favoriserait la prolifération et la migration des cellules d'hépatome (Chen et al. 2012). Une étude récente de notre équipe a montré que la protéine HBSP participerait à la persistance virale en inhibant le recrutement des macrophages et des cellules NK (Duriez et al. 2017). La pathogénicité des variants épissés pourrait également être attribuée à l'augmentation de l'expression des protéines Core et HBx (Rosmorduc et al. 1995, Kandpal et al. 2015).

2- Organisation génétique

Le génome du VHB est une molécule d'ADN circulaire relâché, partiellement double brin et d'environ 3,2 kb selon les génotypes. Le génome viral résulte d'une association entre un brin négatif complet lié de façon covalente à la polymérase virale et d'un brin positif incomplet. Alors que l'extrémité 3' du brin positif est variable, son extrémité 5' est constante et chevauche sur environ 200 paires de bases (région cohésive) les deux extrémités du brin négatif assurant la circularité du génome. La position (+1) du génome est déterminée par la présence d'un site unique de coupure par l'enzyme de restriction EcoRI (Fig. 11B).

a) Les éléments structuraux

Le VHB possède l'un des génomes les plus petits des virus humains connus. Ce génome présente 4 phases de lecture ouverte (ORF ou « Open Reading Frame »), P, C, S et X codant pour les protéines structurales (protéines d'enveloppe, la capsid) et non structurales (la polymérase virale, l'AgHBe et la protéine HBx). Ces ORF, portées par le brin positif sont chevauchantes, et se présentent toutes dans la même orientation transcriptionnelle. L'ORF P couvre 80% du génome et chevauche, en totalité ou partiellement (3' de l'ORF C et 5' de l'ORF X), tous les autres ORF. La fin de l'ORF X chevauche le promoteur de l'ORF C. Ainsi, les différents cadres ouverts de lecture couvrent la totalité du génome. Cette organisation génétique implique que les séquences régulatrices et structurelles, essentielles à la transcription et à la

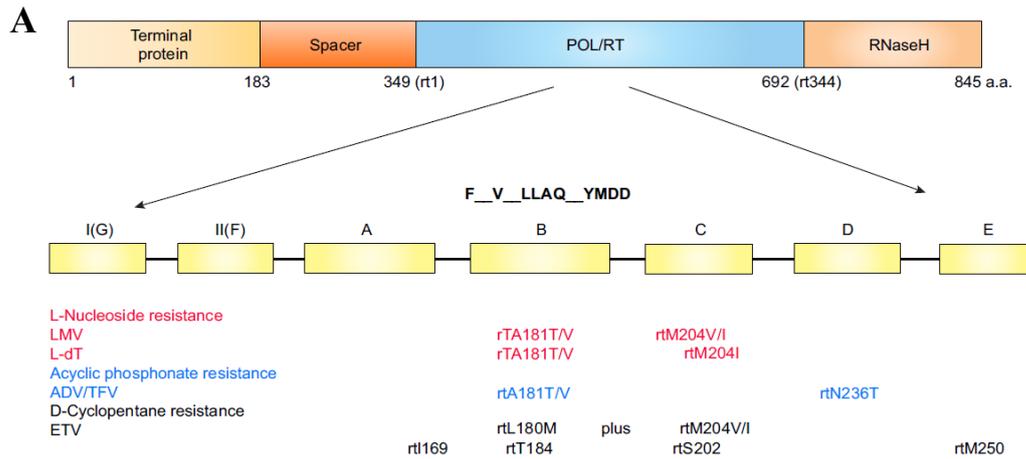
réplication du VHB, sont étroitement imbriquées dans les séquences codantes (Seeger et al. 2000).

Chez les hépadnavirus, la structure des ARN et ADN viraux essentiels pour la réplication virale, est définie par plusieurs éléments structuraux répartis au sein d'une courte séquence du génome d'environ 100 nucléotides (à l'exception de la région DR2). Ces éléments comprennent :

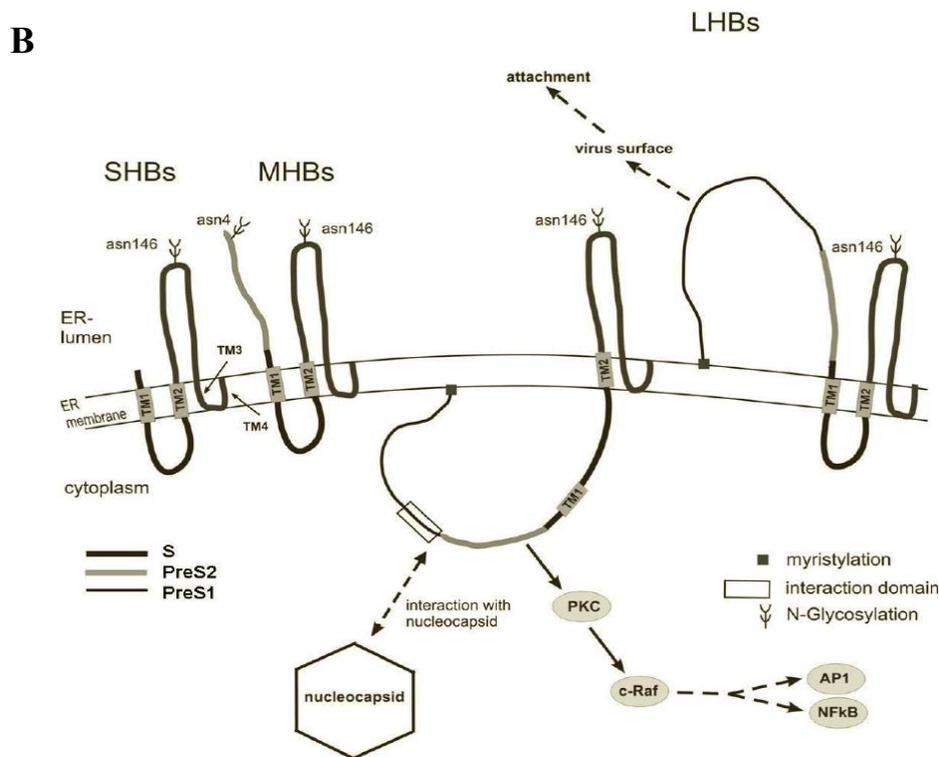
- Deux répétitions directes DR1 et DR2 (pour « Direct repeat »). La séquence DR1 est située immédiatement en 5' du signal d'encapsidation. Les séquences DR1 et DR2 (11 nucléotides chacune chez le VHB contre 12 chez le DVHB) définissent respectivement les extrémités 5' de l'ADN du brin négatif et du brin positif et délimitent la région cohésive qui maintient la circularité de l'ADNrc. Chez le VHB, les séquences DR1 et DR2, distantes de 220 nucléotides (contre une trentaine seulement chez le DVHB), sont essentielles à la réplication virale et constituent aussi le site préférentiel de recombinaison avec le génome cellulaire.
- Un signal d'encapsidation (ϵ), retrouvé à l'extrémité 5' de l'ARNpg sous la forme d'une structure secondaire tige-boucle, permet une encapsidation simultanée de l'ARNpg et de la polymérase virale. Il est également lié à l'initiation de la synthèse de l'ADN du brin négatif.
- Un signal de polyadénylation localisé immédiatement en 3' du signal d'encapsidation, au début de la région codante de la protéine Core. Tous les transcrits viraux sont polyadénylés au même site, et possèdent donc la même extrémité 3'. Les orthohépadnavirus utilisent un signal non canonique « TATAAA », tandis que les avihépadnavirus utilisent le signal de polyadénylation canonique des eucaryotes « AATAAA ».

b) Les éléments régulateurs

La transcription du génome virale est régulée par différents promoteurs (Moolla et al. 2002). Ainsi les différents ARNs sont exprimés à partir de 4 promoteurs (PréC/C, PréS2, PréS1 et X). Le promoteur PréS1 est situé dans l'ORF S, en amont de la région correspondant au gène S. Deux éléments cis-régulateurs de la transcription appelés Enhancers (Enh I et Enh II) sont également présents, en amont et dans le gène X, ainsi qu'un élément cis-régulateur négatif dans le gène X. Les ARN pré-génomique et PréC/C sont transcrits depuis la même région régulatrice, le promoteur core et l'Enhancer II, qui contiennent à la fois des sites de fixation de facteurs de



Tiré de la revue de Shuping Tong et Peter Revill, *Journal of Hepatology* 2016.



Tiré de la revue de Stephanie Schädler et Eberhard Hildt, *Viruses* 2009.

Figure 13 : Gènes et protéines du VHB. (A) Structure du domaine de la polymérase du VHB et les mutations associées. (B). Représentation schématique des protéines d’enveloppe du VHB. Le domaine HBs est commun aux trois protéines d’enveloppe. La protéine SHBs contient 4 domaines transmembranaires et une large boucle exposée à la surface du virion contenant les déterminants antigéniques. La protéine MHBs contient la région S et un domaine PréS2 N-terminal supplémentaire. La protéine LHBs contient la séquence de MHBs et le domaine PréS1 supplémentaire. La protéine LHBs peut présenter deux conformations différentes, soit avec le domaine PréS1/PréS2 orienté dans le cytoplasme servant à l’interaction avec la nucléocapside, soit le domaine PréS1/PréS2 exposé à la surface du virion pour l’attachement du virus à la cellule hôte.

transcriptions ubiquitaires (TBP, SP1) mais aussi hépato-spécifiques comme HNF3 et HNF4 (« Hepatocyte nuclear factor »), jouant un rôle dans la tissu-spécificité de l'expression des ARNs viraux. Le promoteur Prés2 active la transcription de l'ARNm de 2,4 kb codant pour la protéine LHBs, et contient une boîte TATA canonique, et des sites de fixation pour HNF3 et 4, TBP et SP1. Le promoteur Prés1 qui active la transcription de l'ARNm de 2,1 kb codant pour les protéines MHBs et HBs est dénué de boîte TATA, mais contient un motif CCAAT stimulant la transcription de l'ARNm de 2,1 kb et réprimant la transcription de l'ARNm de 2,4 kb. Le promoteur X contient des sites de fixation des facteurs de transcription NF1, C/EBP, ATF, AP1/Jun-Fos.

3- Gènes et protéines virales

a) *L'ORF P et la Polymérase*

Portée par l'ARNpg, l'ORF P code pour la polymérase virale (Pol) et couvre 80% du génome viral. Ses extrémités 5' et 3' chevauchent respectivement l'extrémité 3' de l'ORF C et l'extrémité 5' du gène X. De plus, le gène P chevauche la totalité de l'ORF S. La Pol est une protéine de 90 kDa, de 832 à 845 acides aminés selon le génotype viral. Elle contient quatre domaines structurels distincts, la protéine terminale (TP ou « Terminal protein ») qui est liée de manière covalente à l'amorce d'ADN lors de la synthèse de l'ADN du brin négatif, le domaine « Spacer » tolérant aux mutations, le domaine RT (Transcriptase inverse) et le domaine RNase H (Fig. 13A). Les domaines RT et RNase H sont hautement conservés comme la RT du VIH (Virus de l'immunodéficience humaine) (Das et al. 2001 , Bartholomeusz et al. 2004). Comme la RT du VIH, la RT du VHB est également dépourvue d'activité de « Proofreading » ou correction (Cane et al. 1999 , Gunther et al. 1999). Par conséquent, le VHB présente un taux de mutation estimé à $1,4 \cdot 10^{-5}$ – $3,2 \cdot 10^{-5}$ nucléotides par site par an, ce qui est 10 fois plus élevé que les autres virus à ADN (Nowak et al. 1996, Chotiyaputta et al. 2009). Le taux élevé d'erreur de la RT du VHB provoque des substitutions nucléotidiques fréquentes pendant la réplication du virus, entraînant une diversité génétique des génotypes, des sous-génotypes, des quasi-espèces et de nombreuses mutations dans différentes régions du génome du VHB.

b) L'ORF S et les protéines d'enveloppe

Les régions préS1, préS2 et S (préSurface/Surface) du génome codent pour les 3 protéines d'enveloppe, la petite (S ou AgHBs), la moyenne (préS2) et la grande (préS1). La protéine S constitue la partie majeure des protéines d'enveloppe tandis que les protéines L sont essentielles dans la liaison du VHB aux récepteurs des cellules hôtes et dans l'assemblage et la sécrétion du virion (Fig. 13B).

L'AgHBs est une protéine transmembranaire constituée de 4 domaines hydrophobes parcourant la membrane (TM1 à TM4 localisés au niveau des résidus 8-28, 79-100, 160-184 et 189-210) et dont l'insertion dans le réticulum endoplasmique (RE) est initiée par le domaine TM1 N-terminal. La protéine HBs porte aussi une boucle antigénique, exposée à la surface de la particule, d'une longueur d'environ 70 acides aminés (résidus 100 à 170 environ) et structurée en boucles par des ponts disulfures. Cette boucle antigénique porte le déterminant "a" (résidus 124 à 149), cible d'anticorps neutralisants, et comme précédemment expliqué à l'origine de la classification des différentes souches du VHB en sérotypes. Les travaux de l'équipe de Sureau ont permis de cartographier les éléments de la boucle antigénique responsable de l'infectivité du virus (Abou-Jaoude et al. 2007, Blanchet et al. 2007, Salisse et al. 2009). La protéine S peut être mono-glycosylée au niveau de la boucle antigénique sur un résidu Asn 146 (gp27 représentant 60% des formes environ) ou non (p24 représentant 40 à 50% des formes environ).

La protéine M possède les mêmes séquences et la même topologie membranaire que la protéine S mais présente 55 acides aminés supplémentaires en N-terminale. La protéine M est toujours glycosylée, en plus de l'asparagine 201 (146 sur la protéine S), le domaine PréS2 contient un site de N-glycosylation sur le résidu Asn-4 et un site optionnel de O-glycosylation sur le résidu Thr-37 (à l'exception du génotype A chez qui le résidu Thr est remplacé par un résidu Asp) (Heermann et al. 1984, Tolle et al. 1998). Le rôle exact de la protéine M dans le cycle viral reste peu évident ; en effet son absence *in vivo* dans des cellules infectées n'empêche pas la morphogénèse des particules virales ou leur infectivité (Fernholz et al. 1991). Elle ne semble donc pas essentielle au cycle viral, et son absence du genre Avihepadnavirus renforce cette hypothèse.

La protéine L possède la même séquence que la protéine M avec 108 à 119 acides aminés supplémentaires (en fonction du génotype) en N-terminale. Contrairement à la protéine M, la protéine L est seulement présente sous forme non glycosylée (p43) ou mono-glycosylée sur l'Asn146 du domaine S (gp46). Les deux autres sites potentiels de N-glycosylation (Asn-15 de PréS1 et Asn-4 de PréS2) ne sont pas utilisés en raison de leur localisation cytosolique

(Heermann et al. 1984). Chez les génotypes B et H, comme la protéine M, le domaine PréS2 de la protéine L peut être O-glycosylée sur la Thr37. Bien que cela n'ait pas été montré expérimentalement, la protéine L est probablement ancrée dans le RE (Réticulum endoplasmique) par myristylation à la glycine 2 (Persing et al. 1987). Cette myristylation jouerait un rôle crucial dans les premières étapes du cycle viral (attachement du virus, perte de l'enveloppe). En effet, l'utilisation de peptides thérapeutiques dérivés de la protéine LHBS permet d'inhiber l'infection par le VHB *in vitro* et *in vivo* (Petersen et al. 2008). Les mécanismes précis de cette modification ne sont pas bien compris, mais des enzymes cellulaires comme la N-myristyl-transférase sont probablement impliquées dans ce processus. En revanche, cette myristylation n'est pas indispensable à la morphogénèse ou à la sécrétion des virions. La protéine L peut exister sous deux conformations membranaires (Bruss 2007). Lors de l'insertion dans le RE, la région N-terminale de L (composée des domaines PréS1, PréS2 et TM1) se trouve dans la partie cytosolique et est appelée conformation i-PréS. Le domaine PréS1 de la protéine L peut alors interagir avec les homodimères de protéines de capsid et participer à l'enveloppement de la nucléocapside. Un changement de conformation de la protéine permet une externalisation des régions PréS1 et PréS2 dans la lumière du RE ainsi qu'une insertion du domaine TM1 dans la membrane (conformation e-préS). Les domaines PréS1 alors exposés à la surface du virion permettent l'interaction avec le récepteur. En plus de la protéine S, la principale responsable de la reconnaissance virus/hôte est la région PréS1 de la protéine L d'enveloppe (Glebe et al. 2007).

c) L'ORF C, les protéines Core et l'AgHBc

L'ORF C contient deux codons d'initiation de la traduction en phase au début de la région PréC (87 nucléotides) et de la région C. Elle code pour les protéines Pré-Core, précurseur de l'antigène HBe, et Core, protéine constituant la capsid. La synthèse de la protéine de capsid Core ou AgHBc, est initiée au deuxième codon AUG du cadre de lecture.

La protéine Core (ou AgHBc) est composée de 183 à 185 acides aminés selon le génotype, et la séquence primaire de AgHBc peut être divisée en deux parties : i) un domaine d'assemblage où l'acide aminé 149 ou 151 (selon les génotypes) en N-terminale est suffisant pour l'auto-assemblage des capsides. De plus, la région N-terminale posséderait un site d'interaction avec la protéine L d'enveloppe, entre les acides aminés 76 à 82 jouant un rôle primordial dans l'enveloppement de la capsid (Tan 2002), ii) un domaine de la protamine constitué par l'acide aminé 34 en C-terminale, riche en résidus d'arginine, confère une charge positive à ce domaine.

Ce dernier est essentiel pour l'emballage du complexe pré-génome/Pol du VHB (Gallina et al. 1989 , Zlotnick et al. 1997). Le domaine C-terminale contient plusieurs signaux servant au « shuttling » de la capsid entre le noyau et le cytoplasme. Des signaux de localisation nucléaire (NLS ou « Nuclear localisation signal »), entre les acides aminés 158 et 175 pour le génotype D entre les acides aminés 160 et 177 pour le génotype A (Yeh et al. 1990, Eckhardt et al. 1991 , Kann et al. 1999), et un signal d'export nucléaires (NES ou « Nuclear export signal ») bipartite également génotype dépendant, ont été identifiés. Ces signaux d'entrée sont importants pour l'entrée de la nucléocapsid dans le noyau par les pores nucléaires lors des premières étapes de l'infection, et les signaux d'export suggèrent un « shuttling » constant de la protéine entre cytoplasme et noyau.

L'assemblage de la capsid commence avec la formation d'un dimère d'AgHBc relié par un pont disulfure entre les Cystéine-61 (Nassal 1992 , Zhou et al. 1992). Au cours du cycle répliatif du VHB, l'assemblage de la capsid est initié par la formation du complexe pré-génome/Pol mais dépend également des protéines chaperonnes et kinases cellulaires (Bartenschlager et al. 1992 , Stahl et al. 2007). A la différence des protéines de capsid libres, les protéines formant la nucléocapsid peuvent être phosphorylées grâce à la présence de 7 sérines potentiellement phosphorylables. Trois sérines sont importantes pour la réplication virale (155, 162 et 170 pour le sérotype *ayw* et les sérines 157, 164 et 172 pour le sérotype *adw*). Plusieurs kinases cellulaires, probablement encapsidées avec l'ARNpg, seraient impliquées : la protéine kinase A (PKA), la PKC (Kann et al. 1993), SRPK1 et SRPK2 (pour serine (S)/arginine (R) protein-specific kinases 1 et 2) (Daub et al. 2002), Cdc2 (Yeh et al. 1993) et une protéine kinase de 46 kDa (Kau et al. 1998). L'équipe de Durantel a rapporté récemment, que la polo-like kinase 1 (Plk1) cellulaire stimule la formation de la capsid du VHB (Diab et al. 2017). L'état de phosphorylation ou de déphosphorylation jouerait un rôle dans le mécanisme d'import nucléaire de la capsid (Kann et al. 2007), la réplication de l'ADN (Perlman et al. 2005) mais aussi pour l'encapsidation de l'ARNpg (Lan et al. 1999, Gazina et al. 2000 , Basagoudanavar et al. 2007).

Par ailleurs, une accumulation de la protéine Core dans les PML (Promyelocytic Leukemia) « bodies », structures nucléaires associées aux membranes, a été observée. Ces régions sont impliquées dans la transcription des ARNm et faciliteraient l'export des ARNm dans le cytoplasme (Mabit et al. 2001). La localisation de Core est fonction de son état d'assemblage, de son niveau de phosphorylation/déphosphorylation, du cycle cellulaire (Yeh et al. 1993), du

niveau de réplication virale et de la sévérité de la maladie (Chu et al. 1997 , Serinoz et al. 2003, Kim et al. 2007). Cependant chacune de ces observations restent encore assez controversées.

La protéine Pré-Core (p25) est le précurseur de l'antigène HBe (AgHBe). Elle est synthétisée à partir du premier codon AUG de l'ORF C et possède initialement tous les résidus de l'AgHBc plus 29 acides aminés supplémentaires en N-terminale. Cette région N-terminale est hydrophobe et forme un peptide signal qui dirige la protéine naissante vers le RE, avant d'être clivée pour former la protéine p22. La protéine p22 est reconnue dans sa région C-terminale basique par la furine, et clivée dans l'appareil de Golgi au niveau des résidus 167 et 154, générant ainsi la protéine p20 puis l'AgHBe (p18). L'AgHBe est sécrétée sous forme monomérique et soluble, cependant, une partie de la fraction protéique cytosolique de p22 est métabolisée différemment et pourrait être impliquée dans la persistance virale (Duriez et al. 2008). L'AgHBe n'est nécessaire ni au pouvoir infectieux du virus ni à sa multiplication puisque certains virus sont incapables de le synthétiser (mutants PréC/C). En revanche, la conservation de cette protéine parmi les hépadnavirus indique son importance. Cet antigène servirait de leurre pour le système immunitaire notamment pour diminuer la reconnaissance de l'AgHBc. Ce dernier est un immunogène très puissant, stimulant les réponses humorales et cellulaires. Les anticorps anti-HBc sont des marqueurs sériques précoces de l'infection par le VHB et peuvent persister longtemps après la clairance virale. Ces anticorps ne sont pas neutralisants puisque, dans les virions, l'AgHBc est protégé du système immunitaire par l'enveloppe virale. Cependant, des déterminants antigéniques de l'AgHBc peuvent être exprimés à la surface des cellules infectées et l'AgHBe sert donc à protéger ces cellules. C'est pourquoi la séroconversion anti-HBe, qui signale souvent le début de la clairance virale, est généralement accompagnée d'une augmentation rapide des transaminases sériques suite à la lyse des cellules infectées qui ne sont plus protégées. De plus, p22 pourrait moduler les processus apoptotiques et avoir un rôle important dans la progression de la maladie hépatique (Duriez et al. 2008, Assrir et al. 2010).

d) L'ORF X et la protéine HBx

Chevauchant l'extrémité 3' de l'ORF P et l'extrémité 5' de la région préC, l'ORF X est le plus petit du génome VHB et code pour la protéine HBx ou l'AgHBx. Cette protéine a été caractérisée il y a plus de 30 ans (Kay et al. 1985) et serait constituée de 146 à 154 acides aminés selon les génotypes. Bien que sa structure tertiaire reste non résolue, des analyses comparatives de séquences des orthohépadnavirus ont révélé des régions hautement conservées incluant des

domaines hélicoïdaux en N-terminale et C-terminale et un motif « *Coiled-coil* » putatif. L'identification de la structure du complexe Cul4/DDB1, protéine connue pour interagir avec la protéine HBx, indique la présence d'un motif en hélice α dans la protéine HBx (Li et al. 2010). La protéine HBx aurait la capacité de s'homodimériser (Lin et al. 1989) ; son activité et sa localisation nucléaire ou cytoplasmique seraient influencées par des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, acétylations) (Noh et al. 2004). La protéine HBx peut être détectée dans le noyau malgré l'absence de séquence NLS. Elle reste cependant, principalement cytoplasmique, notamment périnucléaire, mitochondriale ou colocalisée avec le protéasome (Dandri et al. 1996, Henkler et al. 2001, Clippinger et al. 2008). Sa localisation subcellulaire dépendrait de son niveau d'expression avec une présence nucléaire préférentielle en cas d'expression faible, et cytoplasmique lorsque celle-ci augmente; une distribution dynamique de l'HBx dans le contexte de répllication virale semble ainsi envisageable mais reste à démontrer (Forgues et al. 2001, Henkler et al. 2001, Kim et al. 2003). Différentes données ont démontré que la protéine HBx est capable de transactiver la transcription de nombreux gènes cellulaires et viraux (Levrero et al. 2016). Les événements d'intégration du génome du VHB dans le génome cellulaire induisent l'apparition de formes tronquées en C-terminale de la protéine HBx (Voir chapitre HBx pour plus de détails).

III- Biologie de l'infection

A) Epidémiologie

Basée sur la présence de l'AgHBs, la prévalence du VHB varie de 0,1 à 25% de la population selon les régions du monde considérées (Fig. 14); on distingue ainsi :

- Des régions de faibles endémie où la prévalence est inférieure à 2% (Australie, Amérique du Nord, Europe de l'Ouest), pour lesquelles la transmission se fait essentiellement lors de rapports sexuel non protégés, ou par voie parentérale chez les toxicomanes mais aussi et plus rarement lors de transfusions sanguines.
- Des régions de moyenne endémie avec une prévalence comprise entre 2 et 7 % (Europe de l'Est, Russie, pays méditerranéens et Proche-Orient), où la transmission est principalement périnatale ou horizontale.
- Des régions de forte endémie, avec une prévalence de l'antigène HBs supérieure à 7 % et pouvant atteindre 20 % (Afrique sub-saharienne, Asie du Sud-est, Chine, certains

pays d'Europe de l'Est) où la transmission se produit essentiellement de manière verticale.

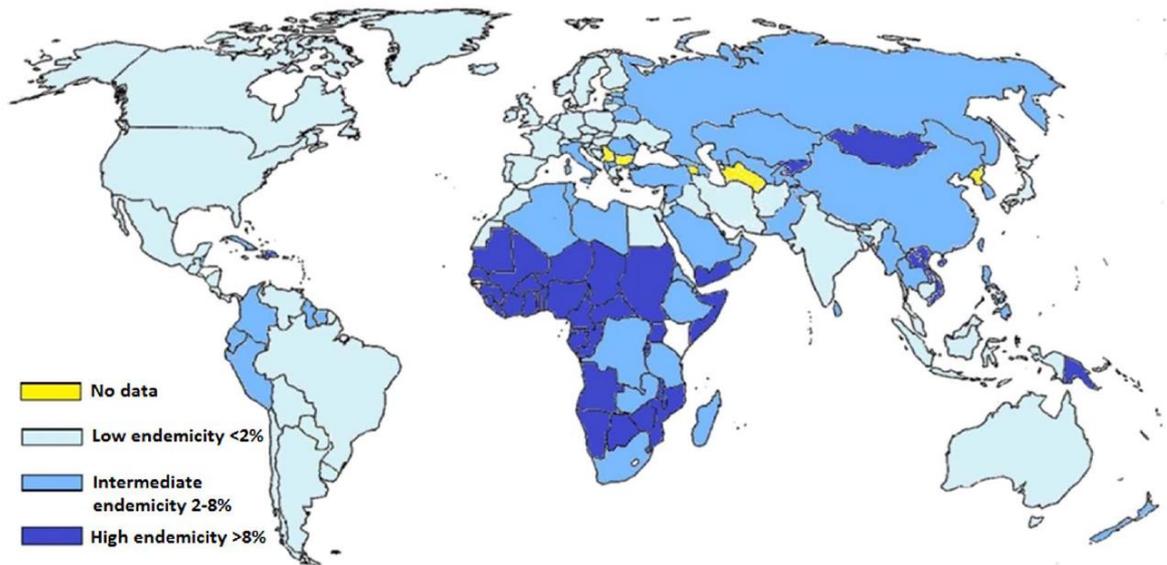
La répartition des génotypes et des sous-types de VHB est géographique dépendante. Les génotypes A (A1-A7) et D (D1-D8) sont les plus fréquents et les plus répandus en Europe et en Afrique; les génotypes B et C se limitent à l'Asie et à l'Océanie. Les sous-génotypes D1-D4 sont retrouvés principalement en Europe, en Afrique et en Asie. Les infections avec les génotypes E, F, G et H ont parfois été observées en Asie. Le génotype I, le plus rare, a été trouvé au Laos, au Vietnam, en Inde et en Chine. Le génotype J a été observé au Japon et Ryukyu (Nannini et al. 2017) (Table 1).

B) Histoire naturelle de l'infection par le VHB

La première phase de l'infection par le VHB est généralement asymptomatique ou peu symptomatique. Cependant, après une période d'incubation de 30 à 180 jours, 20 % des patients déclarent une hépatite aiguë qui peut aller, dans de rares cas, jusqu'à une hépatite fulminante, mortelle en absence de transplantation hépatique (0,1 % des patients infectés). L'hépatite aiguë est caractérisée par un ictère et un taux élevé des transaminases (ALT) dans le sang, conséquence d'une nécro-inflammation hépatique observée lors de la clairance virale. L'infection par le VHB est dite chronique lorsque l'AgHBs persiste dans la circulation sanguine pendant plus de six mois après l'infection. Le portage chronique du VHB peut entraîner à long terme l'apparition d'une hépatite chronique de pathologies variables incluant le développement d'une fibrose excessive, d'une cirrhose et dans des cas extrêmes, un cancer primitif du foie (Fig. 15).

L'histoire naturelle de l'infection chronique B (CHB ou « Chronic Hepatitis B ») dépend en grande partie de l'âge et de l'état du système immunitaire de l'hôte infecté. L'évolution vers une CHB est liée 5 phases (Fig. 16) :

- Une phase initiale répliquative (auparavant nommée phase d'immunotolérance), caractérisée par une charge élevée d'ADN viral dans le sérum (de 10^7 à 10^{12} copies/ml), la présence de l'antigène viral HBe, une concentration en ALT normale ou légèrement élevée, une nécro-inflammation minimale ou absente, faible production d'IL-10 et de cytokines pro-inflammatoires (IL-6/8 et TNF- α). Cette immunotolérance peut durer 10 à 30 ans chez les sujets infectés à la naissance, alors qu'elle est courte voire absente chez l'enfant et l'adulte.



Tiré de la revue de Nannini Pilar et Sokal Etienne M., Archives of Disease in Childhood 2016.

Figure 14 : Répartition de l'endémicité de l'antigène HBs dans le monde de 2011 à 2016.

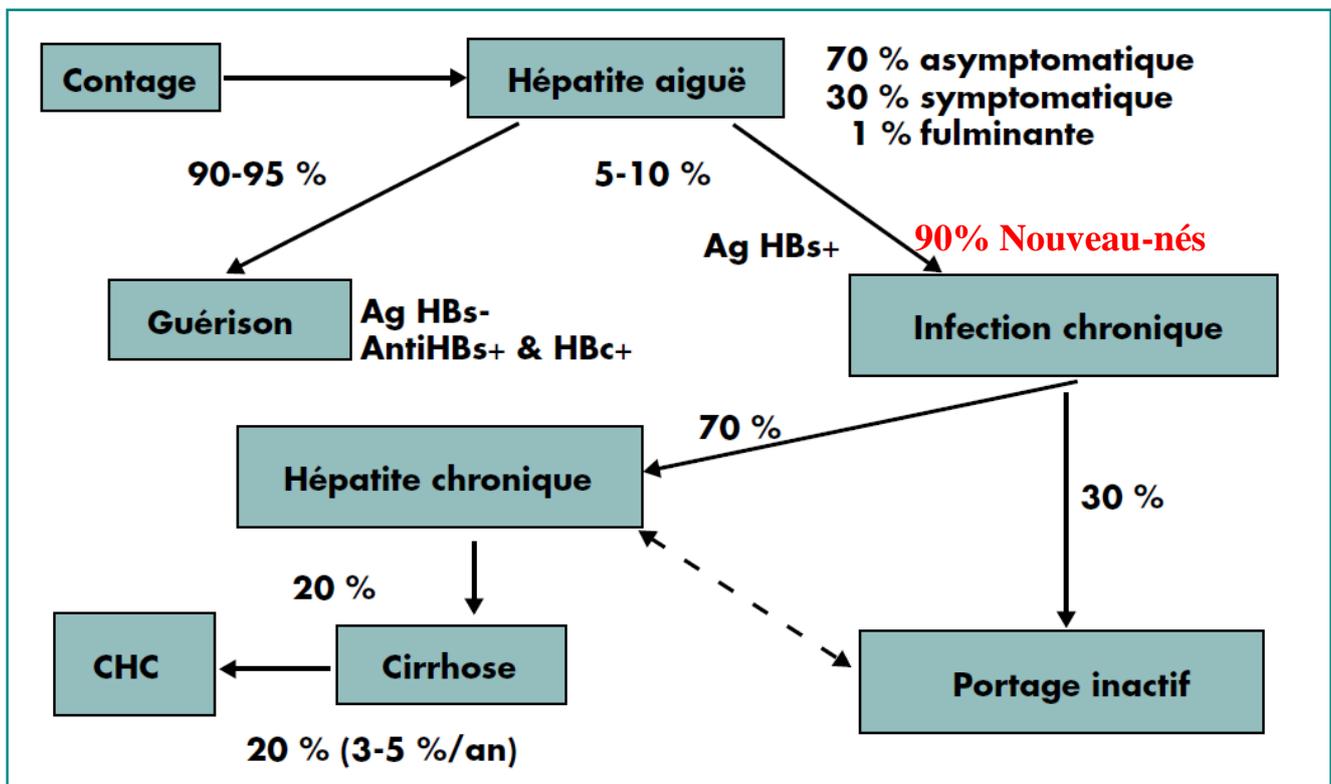
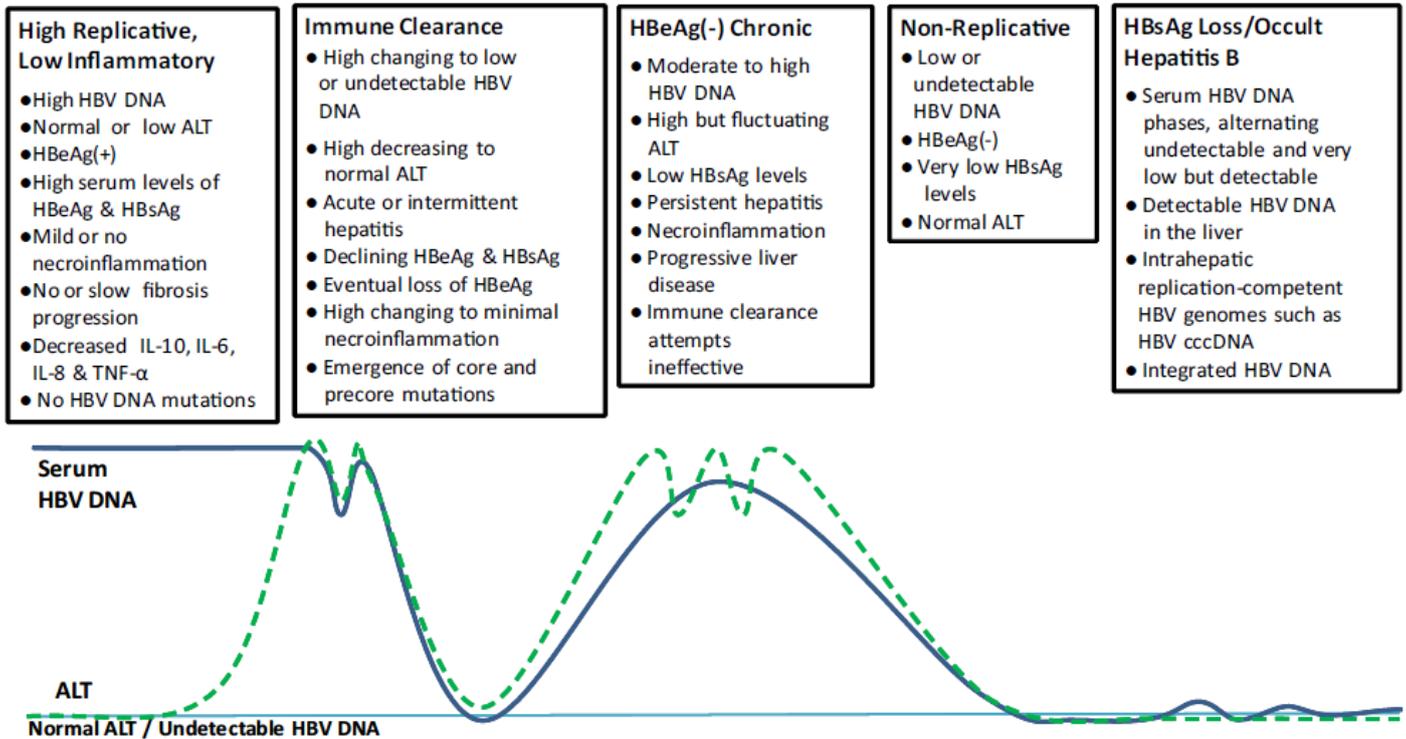


Figure 15 : Histoire naturelle de l'infection virale B.

- Une phase « Immune clearance » ou immuno-active initialement caractérisée par une fluctuation de la charge d'ADN viral sérique et des ALTs. Les fluctuations d'ALT reflètent des changements dans la réponse inflammatoire aiguë ou des épisodes intermittents d'hépatite pouvant conduisant à une éventuelle perte de l'AgHBe. Sur le plan histologique, on observe une nécro-inflammation légère à importante. Cette étape est associée aux mutations « Core/Pré-core » et à une perte de l'AgHBe dans certains patients. Cette phase immuno-active peut durer de quelques mois à plus de 10 ans.
- Une phase d'hépatite chronique à AgHBe négatif marquée par une nécro-inflammation persistante, une charge d'ADN viral modérée ou élevée et une atteinte hépatique accrue.
- Une phase « Non répliquative » autrefois dénommée phase de portage viral inactif se traduit par une charge d'ADN viral sérique faible ou indétectable, un statut AgHBe négatif (séroconversion) et un niveau normal des ALT. Cette phase correspond à un état de contrôle immunologique de l'infection virale que ce soit de façon spontanée ou à la suite de traitements antiviraux. L'incidence et la cinétique de la mise en place de cette séroconversion sont différentes selon le sexe, l'âge, l'éventuel traitement thérapeutique ainsi que le génotype du virus responsable de l'infection. Sur le plan histologique, la séroconversion de l'AgHBe amorce une diminution graduelle de la fibrose hépatique (stade pathologique réversible au contraire de la cirrhose) et la persistance de cette phase peut aboutir à la perte de l'AgHBs et la séroconversion en anti-HBs après plusieurs années d'absence de détection du virus circulant. Bien que ces patients soient souvent diagnostiqués comme ayant résolu l'hépatite B, l'hypothèse d'une infection virale B occulte n'est pas à écarter.
- Une phase « Occult/AgHBs loss » au cours de laquelle il y a perte de l'AgHBs mais persistance d'une réplication virale active. L'ADN viral est détectable dans le foie mais reste faible ou indétectable dans le sérum. Des porteurs inactifs de l'AgHBs peuvent développer une réactivation virale soit spontanément (dans 20 à 30% des cas) soit lors d'une immunosuppression active. En effet, la persistance du génome sous forme épisomale dans le noyau des hépatocytes lui permet de se répliquer de nouveau dès lors que la pression immunitaire se relâche. Au cours de cette phase, l'AgHBe n'est plus détectable, soit due à une mutation induisant un codon stop dans la région pré-C et



Tiré de la revue de Robert G. Gish et collaborateurs, Antiviral Research 2015.

Figure 16 : Les phases majeures de l'infection chronique par le VHB.

interrompant la synthèse de la protéine, soit à cause de mutations dans la région promotrice préC/C conduisant à l'absence d'expression de l'AgHBe. En cas de réactivation du virus sauvage, on observe une nécro-inflammation modérée ou sévère, associée à une concentration en ALT élevée et souvent fluctuante, avec une fibrose de sévérité variable. De tels épisodes de réactivation peuvent induire un dommage hépatique progressif voire une décompensation (échec des processus de réparation hépatique conduisant à une perte de fonctions de l'organe). À l'inverse, la réactivation d'un virus muté, n'exprimant pas l'AgHBe, est souvent asymptomatique et ne peut qu'occasionnellement mimer une hépatite aiguë.

Récemment, deux autres phases ont été proposées en plus de celles énumérées ci-dessus : une phase de clairance de l'ADNccc et une autre d'élimination des cellules ayant subi des événements d'intégration du génome du VHB.

C) Prophylaxie et thérapies existantes

1- La vaccination

Un vaccin contre le VHB est disponible depuis 1982 et, depuis 1991, l'OMS a recommandé une vaccination universelle des nouveau-nés avec un antigène HBs recombinant produit dans la levure. La vaccination permet d'induire la sécrétion d'anticorps neutralisants, pouvant agglutiner les antigènes viraux de surface pour empêcher l'étape d'entrée du virus dans la cellule hôte. Il est admis que le système immunitaire, dès lors qu'il a été capable de produire des anticorps protecteurs (10 mUI/ml) contre le VHB, sera capable, par un mécanisme de mémoire immunitaire, d'induire une protection en cas de contamination. Les études chez des personnes immunisées durant l'enfance montre une bonne efficacité du vaccin avec 15 ans de recul, et 95% des personnes protégées de l'infection chronique (van der Sande et al. 2006, van der Sande et al. 2007). Contrairement aux premiers vaccins contre l'hépatite B d'origine plasmatisque mis sur le marché en 1981 (Hévac B[®] - Pasteur Vaccins), les vaccins recombinants ont démontré un rapport efficacité/sécurité plus élevé. Seuls les vaccins issus de génie génétique sont aujourd'hui autorisés en France. Plusieurs vaccins monovalents occupent actuellement le marché : Genhevac B[®] (Sanofi Pasteur), Engerix B10[®], Engerix B20[®](GlaxoSmithKline), HBVaxPro[®] (Sanofi Pasteur), Fendrix[®] GlaxoSmithKline). Ils diffèrent principalement par la nature des systèmes de production et par la quantité d'AgHBs présente. Des vaccins combinés ont également fait leur apparition. Un vaccin bivalent contre l'hépatite A et l'hépatite B

Twinrix[®] Enfant et Adulte (GlaxoSmithKline) est ainsi proposé. Un vaccin hexavalent Infanrix Hexa[®] (GlaxoSmithKline) est également disponible, protégeant à la fois contre la diphtérie, le tétanos, la coqueluche, *Haemophilus influenzae*, des virus de la poliomyélite et aussi le VHB.

Les vaccins recombinants actuellement utilisés induisent la production d'anticorps anti-HBs contre seulement, ou principalement, un seul épitope du déterminant antigénique "a". L'émergence de mutants d'échappement au vaccin, qui ont des acides aminés mutés dans cet épitope demeure donc possible. Cela pourrait être problématique au fil du temps et en particulier lorsque le vaccin est administré à un nourrisson né de mères ayant des charges élevées d'ADN viral, car la possibilité de mutants préexistants serait élevée. Ainsi, le comité américain sur les pratiques de vaccination (ACIP « Advisory Committee on Immunization Practices ») recommande, l'administration du vaccin contre le VHB associée à une administration passive d'immunoglobulines anti-HBs du VHB à l'accouchement, chez les nourrissons nés de mères infectées par le VHB. Il serait également intéressant de développer de nouveaux vaccins qui induisent des anticorps contre des épitopes potentiels tels que ceux situés dans les régions préS1 et préS2.

2- Les traitements de l'hépatite chronique B

Le traitement des porteurs chroniques vise à réduire le risque de progression de la maladie hépatique aux stades sévères tels que la cirrhose et le cancer du foie. En raison de la persistance du génome du VHB sous forme épisomale dans les hépatocytes infectés, de la demi-vie longue des hépatocytes (6 à 12 mois ou plus) et de la réponse immune compromise, le traitement de l'infection chronique ne peut donc être envisagé que sur une période relativement longue. Le but du traitement sera donc de diminuer la réplication au plus bas niveau possible et sur une période suffisamment longue pour que la totalité de la population d'hépatocytes infectés soit la cible du système immunitaire ou achève son cycle de vie. L'idéal à atteindre reste la perte de l'AgHBs et la séroconversion anti-HBs, signe d'une protection immunitaire contre une réactivation.

L'initiation du traitement chez un porteur chronique, selon EASL (European Association for the Study of the Liver), est basée sur les niveaux d'ALT, la positivité de l'AgHBe, la charge virale sérique, l'histologie du foie, les antécédents familiaux de cirrhose et le CHC ou une maladie du foie coexistant. Les traitements actuels autorisés se définissent en deux groupes majeurs : les immuno-modulateurs et les analogues nucléos(t)idiques.

L'efficacité de ces traitements se mesure par l'amélioration de marqueurs comme la charge virale sérique, la perte d'AgHBe (séroconversion AgHBe), les niveaux d'AST/ALT, de la bilirubine et la biopsie, seule méthode validée pour la mesure du score histologique de fibrose et d'inflammation (Pardo et al. 2007). Deux types de traitements sont disponibles (Tables 2 et 3) :

a) L'interféron- α

Les interférons (IFN) sont des cytokines pléiotropes avec des effets antiviraux, antiprolifératifs et immuno-modulateurs. L'IFN- α , par sa fixation de à son récepteur, déclenche via les voies de signalisation Jak/Stat, l'activation des ISGs (IFN-stimulated genes) et la synthèse de différentes protéines antivirales (Der et al. 1998 , Rawlings et al. 2004), capables d'inhiber : i) la transcription du VHB (Belloni et al. 2012) , ii) l'assemblage et la stabilité de la nucléocapside (Xu et al. 2010), iii) la synthèse de protéines virales (Robek et al. 2002), l'export nucléaire et la stabilité des ARNpg et viraux (Pei et al. 2014). De plus, l'IFN- α augmente l'expression des protéines du c (CMH) de classe I favorisant ainsi les réponses des lymphocytes T CD8⁺, l'activité des macrophages et des cellules NK (Natural Killers) et réduit l'activation des neutrophiles (Brassard et al. 2002). L'IFN- α a été autorisé au début des années 1990, pour le traitement de l'hépatite B chronique. Ses avantages sont une période de traitement courte (3 injections sous-cutanée/semaine pendant 6 mois à 1 an) et l'absence de mutations de résistance. L'IFN- α pégylé suite à l'ajout d'un groupement polyéthylène glycol (PEG), permet d'allonger la demi-vie de la molécule et donc d'alléger la posologie (1 injection par semaine en sous-cutanée pendant 48 semaines). Chez les patients AgHBe positif, un taux élevé d'ALT prétraitement est le plus fort prédicteur de séroconversion AgHBe; ceci associé à une charge viral faible et à un indice d'activité histologique élevé (Heathcote 2003 , Lok et al. 2009).

Les principaux inconvénients de l'IFN- α sont la nécessité d'une administration parentérale et les effets indésirables fréquents pour une efficacité faible (environ 25% de rémission) (Jafri et al. 2010). L'IFN- α est contre-indiqué chez les patients atteints de cirrhose décompensée en raison du risque de sepsis sévères et de dommages hépatiques (Jafri et al. 2010). Il est également proscrit aux patients présentant des exacerbations sévères d'une hépatite chronique B ou une insuffisance hépatique aiguë et chez ceux qui subissent une chimiothérapie immuno-supresseuse ou anticancéreuse. Les troubles de l'humeur, la fatigue, l'alopécie et la dépression augmenteraient également avec la durée de la thérapie (Heathcote 2003).

Generic names	Manufacturer's Name	Indication	Adverse effects
Entecavir	Bristol-Myers Squibb	Adults and children at least 2 years of age and at least 10 kg in weight, with evidence of active viral replication and either evidence of persistent elevations in serum aminotransferases (ALT or AST) or histologically active disease	Most common adverse reactions ($\geq 3\%$, all severity grades) are headache, fatigue, dizziness and nausea
Lamivudine	GlaxoSmithKline	Chronic hepatitis B associated with hepatitis B viral replication and active liver inflammation	Lactic acidosis and severe hepatomegaly with steatosis, including fatal cases, have been reported with the use of nucleoside analogues and other antiretroviral agents. A majority of these cases have been in women. Obesity and prolonged nucleoside exposure may be risk factors
Adefovir dipivoxil	Gilead Sciences	Chronic hepatitis B in patients aged >12 years	Severe acute exacerbations of hepatitis, nephrotoxicity, HIV resistance, lactic acidosis and severe hepatomegaly with steatosis
Interferon α -2b	Schering	Chronic hepatitis B in patients aged ≥ 1 year with compensated liver disease	Depression, difficult or laboured breathing, swelling or puffiness of the face, tightness in the chest and weight loss
Telbivudine	Novartis	Chronic hepatitis B in adult patients with evidence of viral replication and either evidence of persistent elevations in serum aminotransferases (ALT or AST) or histologically active disease	Transient increase of CK, arthralgia, fatigue, pyrexia, headache, elevation in AST and ALT, lactic acidosis, hepatomegaly with steatosis, hypercholesterolaemia, diarrhoea, abdominal pain, nausea, abdominal pain, rash, pruritus, neutropenia and thrombocytopenia
Tenofovir	Gilead Sciences	Chronic hepatitis B in adolescents aged >12 years	Nausea, abdominal pain, diarrhoea, headache, dizziness, fatigue, nasopharyngitis, back pain and skin rash. Renal failure, Fanconi syndrome, proximal renal tubulopathy, increased creatinine, nephrogenic diabetes insipidus and acute tubular necrosis have also been reported during postmarketing experience

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; CK, creatine kinase.

Tiré de la revue de Nannini Pilar et Sokal Etienne M., Archives of Disease in Childhood 2016.

Table 2 : Thérapies approuvées par la FDA (“Food and Drug Administration”) pour le traitement des enfants et adolescents chroniquement infectés par le VHB.

	Lamivudine	Entecavir	Tenofovir	PegIFN α	PegIFN α + lamivudine	Placebo
<i>HBeAg(+)</i>						
HBeAg seroconversion	16-21	21	21	27	24	4-6
Undetectable HBV DNA	40-44	67	76	25	69	0-16
HBsAg loss	<1	2	3	3	3	0
Normalization of ALT	41-77	68	n/a	39	46	7-24
Histologic improvement	49-62	72	74	38	41	25
<i>HBeAg(-)</i>						
Undetectable HBV DNA	60-73	90	93	63	87	0
Normalization of ALT	60-79	78	n/a	38	49	29
Histologic improvement	60 * 66	70	72	48	38	33

Tiré de la revue de Robert G. Gish et collaborateurs, Antiviral Research 2015.

Table 3 : Taux de réponses chez les porteurs chroniques HBe (+) et HBe (-) aux thérapies actuelles. Taux de réponses à 48 ou 52 semaines. Amélioration histologique basée des biopsies obtenues post-traitement.

b) Les analogues nucléos(t)idiques et résistances

Les analogues nucléos(t)idiques (NA) visent la fonction de transcriptase inverse (RT) de la polymérase du VHB en entravant la synthèse de l'ADN viral à partir de l'ARNpg. Les NA approuvés par la FDA (« Food and Drug Administration ») pour le traitement de l'hépatite B chronique, se répartissent en trois groupes : les nucléosides dont la Lamivudine et la Telbivudine; les phosphonates acycliques regroupant le Ténofovir et l'Adéfovir et les analogues de la désoxyguanosine tel que l'Entécavir.

Parmi ces molécules, l'Entécavir et le Ténofovir ont une activité antivirale plus puissante, conduisant à des taux élevés de patients ayant des charges virales circulant nulles ou indétectables, un retour à la normale des ALT et/ou des paramètres histologiques. Une méta-analyse regroupant 5 études a montré que l'incidence du CHC est réduite de 78% dans les cas traités aux NA (Sung et al. 2008). Les NA sont administrés par voie orale et sont bien tolérés. Bien que ces médicaments inhibent sélectivement la réplication de l'ADN du VHB, des traitements prolongés avec des NA induisent rarement une guérison complète de l'infection VHB et une rechute virologique est très fréquente après l'arrêt du traitement. De plus, la nature même de la polymérase, qui ne possède pas d'activité de « Proof-reading », ainsi que le fort taux de réplication induit la présence chez le patient d'une quasi-espèce virale, permettant l'émergence rapide de clones viraux résistants à ce type de molécules. Les mutations de résistance peuvent soit diminuer l'affinité de la polymérase virale à la molécule, soit améliorer la « fitness », on parle alors de mutations compensatrices (Zoulim et al. 2009). Parmi les thérapies NA approuvées pour l'hépatite B, la Lamivudine est associée à un taux de résistance plus élevé tandis que l'Entécavir et le Ténofovir présenteraient des taux de résistance moindre chez les patients NA-naïfs (Jafri et al. 2010). La combinaison de molécules ciblant des étapes différentes de la transcription inverse devrait permettre de diminuer le risque d'émergence de mutants de résistance en empêchant l'adaptation du « fitness » viral aux molécules. Par exemple des porteurs chroniques B traités à l'Entécavir puis à l'IFN- α pégylé présentent des taux de perte de l'AgHBs et l'AgHBe plus élevés que ceux ayant subi une monothérapie (Petersen et al. 2015).

Compte-tenu de leur mode d'action, les NA doivent être utilisés pendant une longue période, ce qui peut conduire au développement de résistance aux traitements. Par exemple, les mutations de résistance à la LMV se développent chez 23% des patients après 12 mois de traitement, passant à 80% au bout de cinq ans de traitement (Lai et al. 2003). Les mutations de résistance aux médicaments sont situées dans le domaine RT de la protéine P. Pour la LMV, la

Table 1 Novel agents for chronic hepatitis B therapy			
Target	Mode of action	Compound	Clinical trial
DAA			
NTCP	Entry inhibitor	Myrcludex-B	Phase IIa
HBV Polymerase	Polymerase inhibitor	Tenofovir alafenamide (GS-7340)	Phase III
		Besifovir (LB80380)	Phase III
cccDNA	Site-specific cleavage of DNA	ZFNs, TALENs, CRISPR/Cas	Pre-clinical
	Inhibition of relax-circular DNA to cccDNA conversion	CCC-0975 CCC-0346	Pre-clinical
	Inhibition of nucleocapsid assembly	AT-61, AT130 Bay 41-4109	Pre-clinical
HBV RNA	Capsid inhibitor	NVR-1221	Phase Ia
	Knock down HBV RNA, viral proteins and HBV DNA	ARC-520	Phase IIa
HBsAg	Blocks HBsAg secretion	REP 9 AC	Phase II
HTA			
Innate immunity	Induce APOBEC3A and APOBEC3B	Lymphotoxin- β receptor agonist	Pre-clinical
	Exogenous interferon stimulation	Toll-like receptor (TLR) agonist (GS-9620)	Phase II
Adaptive immunity	Therapeutic vaccine	GS-4774	Phase II
		DV601	Phase Ib
		TG1050	Phase I
	Immune checkpoint inhibitor to activate CD8 ⁺ T cells	Programmed death-1 (PD-1) inhibitor	Pre-clinical

APOBEC, apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 3A and 3B; cccDNA, covalently closed circular DNA; CRISPR/Cas, clustered regulatory interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and CRISPR associated (Cas) systems; DAA, direct acting anti-virals; HBV, hepatitis B virus; HTA, host targeting agents; NTCP, sodium taurocholate co-transporting polypeptide; TALENs, transcription activator-like effector nucleases; ZFNs, zinc-finger nucleases.

Tiré de la revue de C.-L. Lin et J.-H. Kao, Alimentary Pharmacology and Therapeutics 2016.

Table 4 : Les nouvelles thérapies pour le traitement de l'hépatite chronique B.

mutation rtM204V/I confère une résistance au traitement, mais réduit également la capacité de réplication, qui peut être restaurée par des mutations compensatrices telles que rtL180M et/ou rtV173L (Ono et al. 2001 , Delaney et al. 2003). La résistance à l'ADV est conférée par la mutation rtA181T/V ou rtN236T. La résistance à l'ETV nécessite de multiples mutations en plus de celles qui confèrent une résistance à la LMV, ce qui signifie une barrière génétique plus élevée. Cependant, dans le cadre d'une résistance préalable à la LMV, des taux élevés de résistance à l'ETV et à l'ADV peuvent se produire en raison de résistance croisée. Bien que les mutations conférant une résistance au TDF semblent peu fréquentes même après 5 ans de traitement (Marcellin et al. 2008, Marcellin et al. 2014), certaines mutations peuvent réduire la sensibilité virale au traitement TDF (Sheldon et al. 2005).

D) Les nouvelles approches thérapeutiques (voir Table)

1- Les DAA (« Direct Acting Antivirals »)

Afin d'obtenir des taux significatifs de réponses virologiques soutenues ou de remèdes fonctionnels, des antiviraux avec de nouveaux mécanismes d'action sont nécessaires (Table 4).

a) Analogues nucléos(t)idiques de 2^{ème} génération

Ils permettent de limiter l'émergence de mutations de résistance : i) le Ténofovir alafénamide (GS-7340 ou TAF) est un Ténofovir de 2^{ème} génération avec une toxicité rénale plus faible (Scott et al. 2017), ii) le Bésifovir (LB80380) est un nouvel et puissant analogue de la guanosine, capable d'inhiber la réplication du virus sauvage comme celle des mutants (Lai et al. 2014). Bien que le Ténofovir alafénamide et le Bésifovir soient efficaces et plus sûr, ils n'influencent pas directement l'ADNccc intrahépatique.

b) Les inhibiteurs d'entrée

Le Myrcludex-B, est un lipopeptide synthétique dérivé du domaine pré-S1 de la protéine d'enveloppe du VHB et cible le NTCP (« Sodium Taurocholate Co-transporting Polypeptide »). Son efficacité a été démontrée chez les souris humanisées infectées par le VHB (Volz et al. 2013 , Urban et al. 2014).

c) Les inhibiteurs d'assemblage de la capsid

Plusieurs composés potentiellement efficaces dans l'inhibition de l'assemblage de nucléocapside ont été identifiés. Les dérivés de Phényl-propénamide (par exemple AT-61, AT130) et de Sulfamoyl-benzamide empêchent l'encapsidation de l'ARNpg. Les Hétéroaryl-dihydropyrimidines (Bay 41-4109) induiraient un assemblage inapproprié de la nucléocapside (Stray et al. 2006 , Brezillon et al. 2011). Ils seraient efficaces à la fois sur le virus sauvages et les résistants aux NA (Campagna et al. 2013).

d) Les inhibiteurs de l'ADNccc

Trois stratégies ciblant l'ADNccc sont en cours d'étude : les nucléases de type « Zinc finger » (ZFNs), les nucléases effectrices « Transcription activator-like » (TALENs) et les endonucléase de type « CRISPR/Cas » (Maepa et al. 2015). Leur capacité à inhiber la réplication du VHB soit en clivant l'ADN viral soit en induisant des mutations inactivatrices, a été démontré *in vitro* (Lin et al. 2016). Des stratégies alternatives ciblant l'ADNccc ont récemment été identifiées : la famille des Sulfonamides disubstitués nommés CCC-0975 et CCC-0346 seraient capables de bloquer l'étape de conversion de l'ADNrc en ADNccc (Cai et al. 2012).

e) Les inhibiteurs de la sécrétion de l'AgHBs

Le REP 2055 (REP9AC) est un polymère d'acide nucléique. Son efficacité a été démontrée chez les canards présentant une infection VHB persistante. (Noordeen et al. 2015). En effet, le traitement au REP 2055 conduit à une diminution rapide de l'AgHBs dans le sérum des canards infectés. Cette observation peut être également liée à la capacité de REP 2055 à bloquer la sécrétion de l'AgHBs par les hépatocytes infectés.

f) Les ARNs interférents

Le rôle des protéines virales (HBs, capsid ou HBx) dans la pathogenèse du VHB est bien décrit (Boni et al. 2012, Yang et al. 2015). Développer des stratégies les ciblant paraît donc évident : L'ARC-520 est un polyconjugué dynamique dans lequel l'ARN interférant cible directement les transcrits du VHB. Son efficacité a été démontrée dans les souris transgéniques HBV et il est actuellement en essai clinique (Wooddell et al. 2013 , Gish et al. 2015).

2- Les « Enhancers » de la réponse immunitaire

Les réponses immunitaires innée et adaptative, représentent un axe important dans la défense de l'hôte contre l'infection par le VHB. Les thérapies immuno-modulatrices jouent donc un rôle essentiel dans la clairance des cellules infectées par le VHB. La première approche vaccinale thérapeutique basée sur la stimulation du système immunitaire des porteurs chroniques avec des antigènes viraux a été sans succès. Ensuite, sont arrivés les vaccins à ADN basé sur le fait qu'une injection sous-cutanée d'un plasmide codant pour un antigène donné (préS, Core) conduit au développement d'une réponse immunitaire humorale et cellulaire en particulier une réponse Th1. Bien que les vaccins thérapeutiques à base d'ADN aient démontré une efficacité dans un modèle d'infection chronique (Mancini et al. 1996 , Rollier et al. 1999, Pancholi et al. 2001), les études cliniques chez l'homme, ont été décevantes. Actuellement, différentes stratégies (système d'électroporation, molécules adjuvantes, immunisation prime-boost) visant à améliorer ces vaccins à ADN sont en cours d'exploration (Cova 2017).

Récemment, l'équipe d'Inchauspé a développé un nouveau vaccin thérapeutique à base d'adénovirus, TG1050, codant pour le core, la polymérase et les protéines d'enveloppe. La capacité de TG1050 à induire une réponse mémoire T CD8⁺ spécifique du VHB a été démontrée *in vivo* (Martin et al. 2015). Quant à GS-4774, vaccin thérapeutique exprimant des régions bien conservées des protéines de VHB, induirait une immunisation spécifique contre le VHB chez des sujets sains (Gaggar et al. 2014).

Par ailleurs, une étude de l'équipe de Protzer, a démontré récemment, que les agonistes des récepteurs de la lymphotoxine- β induisaient une dégradation non cytotolytique de l'ADNccc (Lucifora et al. 2014). Par ailleurs, les agonistes de TLR (Toll-like receptor) tels que GS-9620, un agoniste de TLR7, a révélé une efficacité redoutable dans sa capacité à détruire l'ADN du VHB dans les modèles de chimpanzé et de la marmotte (Lanford et al. 2013 , Menne et al. 2015). L'efficacité thérapeutique de ces nouvelles thérapies anti-VHB nécessiterait cependant des études plus approfondies chez l'homme.

En conclusion, les thérapies actuelles, bien que plutôt efficace pour réduire la réplication virale ne garantissent pas la clairance virale. Des approches thérapeutiques ciblant directement l'ADNccc, forme de persistance virale, semblent donc indispensables pour le traitement des porteurs chroniques. L'arrivée de thérapies de nouvelles générations et des stratégies de combinaison thérapeutique devraient améliorer la prise en charge des patients.

IV- Pathogenèse du VHB

Bien que plusieurs traitements soient disponibles pour contrôler la réplication virale et éviter les dommages progressifs du tissu hépatique, il n'y a toujours pas de remède permettant une guérison complète des porteurs chroniques. L'infection chronique par le VHB est responsable de plus de 500000 décès par an dans le monde et reste donc un problème majeur de santé publique. Le lien entre infections chroniques par le VHB et cancers du foie est très clairement établi, puisque les observations épidémiologiques montrent une corrélation entre la prévalence de l'AgHBs et le développement du CHC (Carcinome hépatocellulaire) (Fig. 17). L'oncogenèse liée à l'infection par le VHB est un processus multifactoriel; en effet, des facteurs environnementaux et comportementaux (alcoolisme, tabagisme, carcinogènes chimiques) potentialisent les effets de l'infection par le VHB. La pathogenèse du VHB résulterait de l'association de deux composantes majeures, une composante immuno-dépendante et une composante immuno-indépendante impliquant directement le virus (Fig. 18) (Transy et al. 1992, Tennant et al. 2004, Chisari et al. 2010).

A) Rôle de l'immunité dans les infections aiguë et chronique

L'orientation clinique dépend de l'âge de survenue de l'infection par le VHB (90% des nouveau-nés infectés évoluent vers une maladie chronique contre 5% des adultes). Cette disparité peut être attribuée à un système immunitaire immature dans la petite enfance. Plusieurs études ont démontré que la maturation des cellules de Kupffer, joue un rôle important dans l'induction de la réponse immunitaire anti-VHB pendant la transition entre la phase d'activation immunitaire et la phase de tolérance immunitaire (Publicover et al. 2013, Chou et al. 2015). Pendant ces phases d'activation et de tolérance immunitaire, une dérégulation de la production d'IL-10, un changement dans la réponse des lymphocytes T de type Th1 et dans l'interaction des lymphocytes T effecteurs, ont également été rapportés.

Dans les cas où le VHB persiste après l'infection initiale à l'âge adulte, l'augmentation de l'expression des récepteurs inhibiteurs comme PD-1 («Programmed cell death 1») a été observée sur les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du VHB et les cellules T régulatrices. En effet, une infection persistante du VHB peut être maintenue par l'induction de la tolérance immunitaire hépatique par une augmentation de la production d'IL-10 à partir de cellules de Kupffer, la diminution de la production d'IFN- α et d'IFN- γ respectivement par les cellules dendritiques (DC) et les cellules Natural Killer (NK) et l'apoptose de lymphocytes T

cytotoxiques (CTL) spécifiques du VHB induite par l'activation des cellules NK (Zhang et al. 2011, Peppas et al. 2013).

1- Immunité innée

Toutes les cellules présentent des senseurs cellulaires appelés PRR (« Pattern recognition receptor »), impliqués dans la réponse antivirale. Les PRR regroupent : les TLR (« Toll like receptors »), les hélicases de type RIG-I (« Retinoic acid inducible gene I ») et les récepteurs NOD-like. Lorsqu'ils sont activés par l'interaction avec un motif particulier, un PAMP (« Pathogen associated molecular patterns »), ils induisent une réponse cellulaire de type IFN- α/β . Il existe aussi une réponse immunitaire innée cellulaire, composée de macrophages résidents du foie, les cellules de Küpffer, de cellules NK, de NKT (« Natural Killer T ») et iNKT (pour invariant NKT), mais aussi de cellules dendritiques (DC) et de cellules endothéliales (LSEC). Les cellules dendritiques et les cellules de Kupffer peuvent phagocyter les particules virales, les LSEC peuvent les faire transiter depuis la circulation vers le parenchyme par macro-pinocytose, et les NK et NKT sont capables de sécréter des cytokines et d'avoir une activité cytotoxique.

Les cellules NK et NKT peuvent être rapidement recrutées sur le site de l'infection, et peuvent reconnaître les cellules infectées via des signaux de stress à la surface des hépatocytes infectés ou des cellules dendritiques (Trobonjaca et al. 2001), ou via une reconnaissance directe de composants viraux (Baron et al. 2002 , Parekh et al. 2007). Leur activité cytotoxique est dépendante d'interactions entre des motifs cellulaires et des récepteurs membranaires KAR (« Killing activator receptor »), activateurs des propriétés cytotoxiques de la cellule, ou inhibiteurs KIR (« Killing inhibitor receptor »). Les cellules NK peuvent aussi avoir une activité cytotoxique via la voie TRAIL et peuvent également sécréter des cytokines antivirales (IFN- γ , TNF- α) ou immuno-modulatrices (IL-3, GM-CSF, M-CSF). De plus, des études menées chez des patients atteints d'hépatite aiguë révèlent que les populations de NK et de NKT (« Natural killer T ») augmentent avant le pic de réplication virale, puis diminuent de façon concomitante avec la baisse de la charge virale (Dunn et al. 2009). Des études approfondies de la réponse immunitaire chez les patients qui ont naturellement éliminé l'infection par le VHB sans élévation d'ALT, ont montré que l'augmentation de la production d'IFN- γ induisait l'activation des cellules NK et un nombre croissant de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques du VHB (Fisicaro et al. 2009). D'autres études chez la souris (Guidotti et al. 1999) et chez l'homme, ont

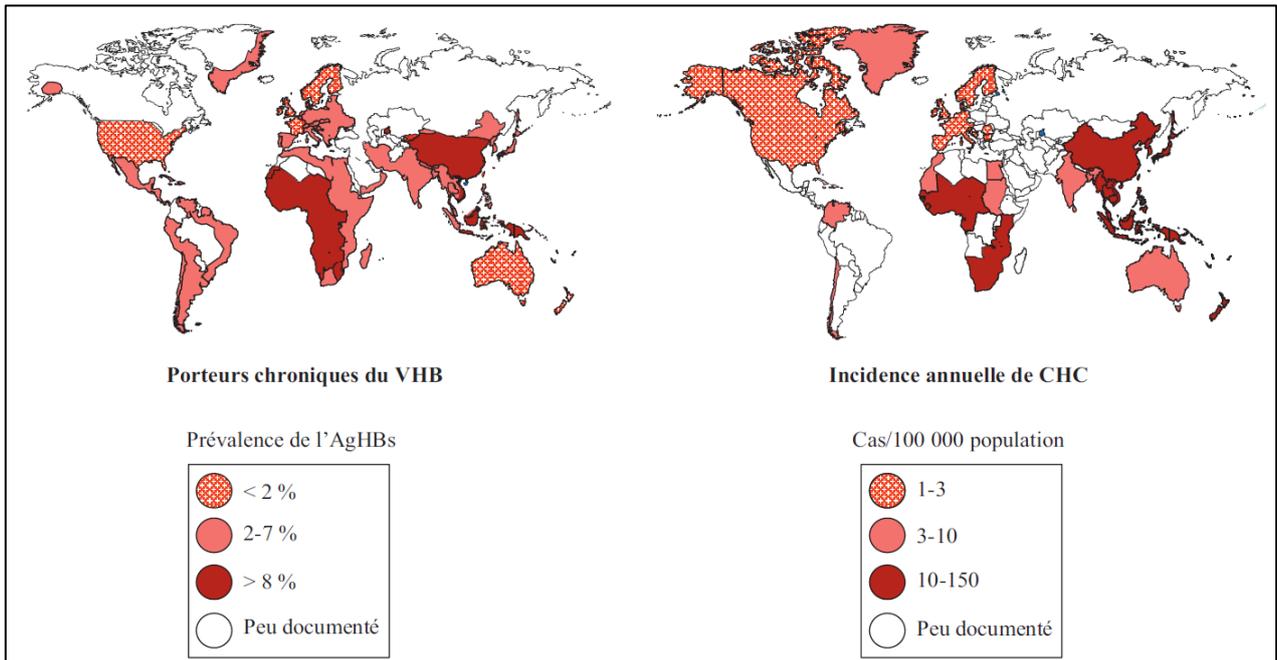


Figure 17 : Prévalence mondiale des hépatites virales B comparée à l'incidence du CHC
(Adapté de Yang et Roberts, 2010).

rapporté que, l'inhibition de la réplication du VHB et la diminution de l'ADNccc intrahépatique par l'IFN- γ passait par un mécanisme non cytopathique et que l'IFN- γ était à la fois produit par les cellules NK/NKT mais aussi par les lymphocytes T CD8⁺ durant les étapes précoces de l'infection (Fisicaro et al. 2009).

Par ailleurs, les IFN- α et β (interférons de type I) sont capables d'inhiber la formation de nouvelles nucléocapsides, de déstabiliser les capsides déjà formées et d'induire la dégradation des ARN du VHB (Dumortier et al. 2005) (Klocker et al. 2000) (Uprichard et al. 2003). En effet, l'activation de la voie IFN de type I a été observée *in vitro* après un transfert du génome du VHB dans des cellules HepaRG par un système de baculovirus (Lucifora et al. 2010). Il a récemment été démontré que MDA-5 (« Melanoma differentiation-associated gene 5 ») et RIG-I, senseurs cytosoliques d'ARN, sont capables de répondre à une infection par le VHB. En effet, une augmentation de la réplication du VHB a été observée dans les cellules Huh-7 et les souris C57BL/6 déficientes en MAD-5 sans une induction robuste d'IFN- β *in vitro* quand MAD-5 est ré-exprimé par transfection (Lu et al. 2013). Il a également été rapporté dans les hépatocytes primaires humains et dans les souris humanisées, que la reconnaissance de la structure « ϵ » (epsilon) en 5' de l'ARNpg par RIG-I, induisait une réponse IFN- λ (Sato et al. 2015). Bien qu'il ait été également prouvé que les TLR pourraient jouer un rôle dans la clairance du VHB, du fait que l'activation de la signalisation TLR augmentant la production des IFN- α et β (Boehme et al. 2004), les ligands directs de TLR durant l'infection du VHB ne sont pas connus. Ces résultats indiquent que l'activation de l'immunité innée revêt une importance cruciale dans l'élimination naturelle du VHB et que l'activation immunitaire innée précède le développement de l'immunité acquise dans l'infection par le VHB.

De manière surprenante, l'absence d'induction de l'expression des gènes de l'immunité (IFN- γ , OAS, CD3) a été rapportée dans le foie de chimpanzés quelques heures après inoculation du VHB (Wieland et al. 2004). De plus, durant les étapes précoces de l'infection, aucune activation des cellules de l'immunité innée n'a été observée. La détection d'IFN- γ , d'IL-2, de TNF- α ainsi que le recrutement de cellules inflammatoires ne survient qu'après la phase de réplication active du virus. De plus, lors du suivi de l'immunité innée chez des patients au stade d'infection aiguë, l'équipe de Maini a démontré l'absence totale d'induction d'IFN- α , λ ou d'IL-15, cytokine importante pour l'activité des cellules NK (Dunn et al. 2009). Les auteurs ont par contre pu mettre en évidence une corrélation entre la cinétique de réplication virale et la sécrétion de l'IL-10, cytokine immunosuppressive. En effet, des études dans des lignées cellulaires dérivées d'hépatome ont montré, que la polymérase virale et la protéine HBx inhibent l'expression des

protéines stimulant la réponse interféron mais également la signalisation antivirale de la mitochondrie (Wei et al. 2010, Liu et al. 2015). Ainsi, il a été rapporté que, la Pol du VHB empêche l'activation de l'IRF-3 (« Interferon regulatory factor 3 ») (Wang et al. 2010 , Yu et al. 2010) et interfère avec la signalisation STING (« Stimulator of interferon genes ») responsable de l'induction d'IFN- β (Liu et al. 2015). De plus, la protéine HBx régulerait négativement l'immunité innée en ciblant la protéine de signalisation antivirale mitochondriale (MAVS) (Wei et al. 2010, Kumar et al. 2011) et la protéine TRIF (« TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β ») (Hong et al. 2015). Ces données indiquent que le VHB peut activer différents senseurs cytosoliques, mais possède également des stratégies d'évasion robustes pour lutter contre la réponse de défense cellulaire et la production d'interféron.

2- Immunité adaptative

a) Réponse cellulaire

L'immunité à médiation cellulaire est essentielle pour la clairance de l'infection par le VHB. Lors de l'hépatite B aiguë, les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VHB entrent dans le foie et produisent de l'IFN- γ (Thimme et al. 2003). Les études sur les chimpanzés ont montré que les cellules T CD8⁺ sont essentielles pour éliminer le VHB. L'épuisement ou la suractivation de ces dernières lors de l'amplification du VHB, induit la perte de la capacité à éradiquer le virus dans les animaux infectés (Asabe et al. 2009). En revanche, l'épuisement des cellules T CD4⁺ dans l'hépatite B aiguë, a peu d'effet sur l'éradication du VHB. Cependant, la déplétion des cellules T CD4⁺ avant l'infection par le VHB, nuit à l'éradication du VHB en diminuant la migration des lymphocytes T CD8⁺ dans le foie (Asabe et al. 2009). Ces résultats indiquent que le « Priming » précoce des lymphocytes T CD4⁺ par le VHB et la taille de l'inoculum (nombre d'équivalents génomes VHB/entité infectée) sont d'une importance capitale pour l'éradication du virus. Une réponse CD4⁺ spécifique du VHB est donc requise pour induire une réponse cytotoxique CD8⁺ efficace. Une forte réponse CD4⁺ contre plusieurs épitopes de la protéine Core est détectée en périphérie chez quasiment tous les patients ayant spontanément résolu l'infection (Penna et al. 1997). En revanche, la réponse CD4 est plus faible chez les patients chroniquement infectés. Le profil cytokinique des lymphocytes CD4⁺ spécifiques de l'AgHBc chez les patients ayant résolu l'infection est de type Th1 avec une sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α , indiquant la possible participation de ces cellules au dommage hépatique.

Les lymphocytes T CD8⁺ possèdent deux activités antivirales, une activité cytotoxique (CTL ou « Cytotoxic T lymphocyte »), et une activité de sécrétion de cytokines (IFN- γ , TNF- α). En effet, l'activation d'une réponse polyclonale, multispécifique, dirigée aussi bien contre l'AgHBc, l'AgHBs, la polymérase et HBx est détectée chez les patients ayant résolu l'infection. Les CTL sont responsables de la pathologie hépatique. Ainsi, des études entreprises chez des souris transgéniques pour le VHB, ont montré qu'un transfert adoptif de cellules T CD8⁺ spécifiques de l'AgHBs au niveau du foie pouvait induire une nécro-inflammation comparable à celle retrouvée chez des patients en phase aiguë de l'infection (Moriyama et al. 1990, Ando et al. 1993). De plus, l'étude chez des chimpanzés infectés par le VHB indique que l'apparition des lésions hépatiques coïncide avec l'afflux de CTL dans le foie, et que leur déplétion retarde l'apparition des symptômes. D'autres données semblent indiquer que les CTL ne sont pas les seules responsables de la pathologie hépatique. Une étude a montré que la fréquence absolue de cellules CD8⁺ intrahépatiques spécifiques du VHB était similaire chez des patients avec ou sans inflammation (Maini et al. 2000).

Les lymphocytes T peuvent éliminer efficacement l'infection par le VHB pendant la phase aiguë mais au cours de la phase chronique, ils deviennent non répondeurs en raison de l'épuisement (stimulation excessive). En effet, lors d'une infection chronique B, les cellules T expriment des niveaux moindres de CD127 (IL-7R) mais des niveaux plus élevés de PD-1 et de CTLA4 (Peng et al. 2008, Schurich et al. 2011). Ainsi, dans les lymphocytes T de porteurs chroniques du VHB, les niveaux inférieurs de PD-1 corrélaient avec des niveaux élevés de T-bet, un facteur de transcription qui régule négativement l'expression de PD-1 (Schurich et al. 2013). De la même façon, il a été observé dans le sang de patients infectés, une surexpression simultanée de PD-1 et d'un récepteur inhibiteur 2B4 (Raziorrouh et al. 2010). Par conséquent, il a été postulé qu'une augmentation de l'expression des récepteurs cellulaires inhibiteurs, provoque l'épuisement des cellules T dans l'hépatite chronique B conduisant à une diminution de la réponse T fonctionnelle contre les hépatocytes infectés.

Par ailleurs, ces dernières années, des études détaillées du rôle des cellules T régulatrices (Treg) et T helper 17 (Th17) dans l'infection B chronique, ont révélé une augmentation du nombre de cellules Treg dans le sang périphérique et plus important encore dans le foie. Il existe également des preuves indiquant que les Treg diminuent les réponses des lymphocytes T effecteurs spécifiques du VHB (Stoop et al. 2005, Aalaei-Andabili et al. 2012). De plus, les Tregs contrôlent le recrutement des macrophages et les cellules dendritiques dans le foie infecté et entravant une réponse immunitaire efficace (Stross et al. 2012).

b) Réponse humorale

La résolution de l'infection VHB, est associée à la production d'anticorps dirigés contre HBs, HBc et HBe. Ces anticorps peuvent perdurer chez un individu après la guérison, et lui conférer une immunité par un mécanisme de mémoire lymphocytaire. Les anticorps anti-HBs inhibent

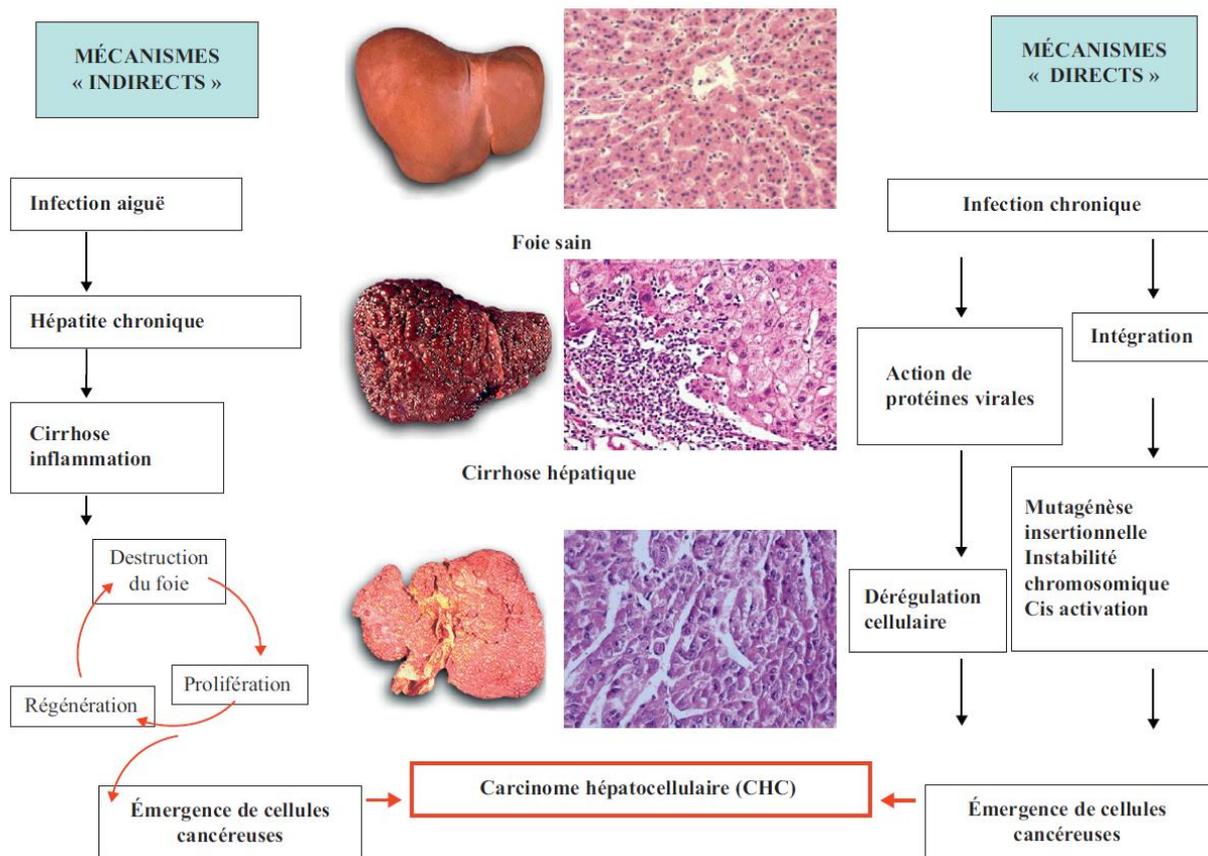


Figure 18 : Infection chronique par le VHB et carcinogénèse hépatique. Le développement du carcinome hépatocellulaire résulte de l'association de deux composantes, une composante immuno-dépendante (mécanismes indirects) à l'origine d'une cytolysé hépatique, favorisant la prolifération cellulaire et une composante immuno-indépendante impliquant les phénomènes d'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire et l'expression de protéines virales (mécanismes directs).

l'infection par le VHB en empêchant l'attachement du virus aux hépatocytes. Ils facilitent également la clairance virale en se complexant aux particules virales libres et en les éliminant de la circulation. Par un mécanisme similaire, ces anticorps peuvent faciliter la présentation d'antigènes viraux par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles au niveau des organes lymphoïdes secondaires et ainsi augmenter la présentation et l'activation des lymphocytes T et lymphocytes B. Enfin, les anticorps neutralisants interviennent dans l'immunopathogénèse et dans le processus antiviral en activant des molécules du complément, ces dernières ayant la capacité de lyser les complexes virus anticorps ou les cellules infectées (Burton et al. 2000). L'induction d'anticorps anti-HBs par immunisation est un processus dépendant des lymphocytes T et nécessite l'aide des lymphocytes T CD4⁺ (Baron et al. 2002). Bien que les anticorps neutralisants anti-HBs soient essentiels pour assurer une protection après la vaccination, leur importance pour résoudre l'infection naturelle du VHB est quelque peu sous-estimée, principalement parce que leur apparition se produit relativement tardivement après l'exposition au virus (Chisari et al. 1995).

B) Pathogénèse virale B directe

De nombreuses preuves ont montré que la diversité génétique du VHB joue un rôle important dans la modulation de sa pathogénèse. Il a été constaté que les génotypes, les sous-génotypes du VHB et les mutations dans certaines régions du génome viral (préCore/Core, PréS et HBx), influent sur l'évolution vers la chronicité et l'apparition d'un cancer primitif du foie (Chan et al. 2004). Par ailleurs, l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire peut être à l'origine d'une instabilité chromosomique, d'une dérégulation de l'activité de gènes cellulaires par cis-activation ou d'une mutagenèse insertionnelle. De plus, l'expression de certaines protéines virales est indirectement impliquée dans la pathogénèse virale via leur effet immunotolérologène (AgHBe) ou via la déstabilisation de voies de transduction des signaux impliquées dans la mise en place de la réponse immunitaire (Faure-Dupuy et al. 2017). Mais il semble également qu'au moins une des protéines virales, la protéine HBx, soit directement impliquée dans la mise en place d'une « Pathogénèse directe » en dérégulant de nombreuses voies cellulaires impliquées notamment dans la viabilité cellulaire, la prolifération cellulaire et la carcinogénèse hépatique. Nous avons choisi d'aborder uniquement l'impact des événements d'intégration, de la variabilité génotypique et de la protéine HBx dans la carcinogénèse hépatique.

1- Impact de l'intégration

L'intégration de l'ADN viral dans le chromosome de l'hôte est une caractéristique commune des *Hepadnaviridae* (Mason et al. 2005, Mason et al. 2010). Au cours de la réplication du VHB, l'intégration du génome viral (forme ADNdsI ou ADN linéaire double brin) tout au long du génome de l'hôte se produit avec des délétions terminales fréquentes allant jusqu'à 200 pb (Yang et al. 1999, Mason et al. 2010). Les études *in vitro* dans le modèle d'infection par le DVHB montrent que l'intégration se produit de manière préférentielle sur les sites de cassure double brin de l'ADN dans le génome cellulaire (Bill et al. 2004). L'agencement structurel de la forme intégrée affecte nécessairement l'expression de tous les cadres de lecture ouverts viraux. Comme la forme ADNdsI est plus longue d'environ 16 nucléotides que la longueur du génome normal, l'ADN intégré du VHB est incapable de produire de l'ARNpg, ce qui représente une impasse répliquative pour le virus. Tout en conservant leur intégrité, les ORFs de la Pol et des antigènes HBe/HBc sont séparés de leurs promoteurs dans la forme intégrée. En effet, il a été montré que, dans la lignée cellulaire PLC/PRF/5 ayant intégré quatre génomes du VHB, seuls les transcrits du gène S sont exprimés (Edman et al. 1980, Twist et al. 1981). Cependant, d'autres CHC se sont révélés exprimant des transcrits contenant les ORFs de AgHBe/AgHBc, vraisemblablement en raison des promoteurs cellulaires actifs en amont du site d'intégration (Lee et al. 1999). Enfin, l'enhancer 1 est connu pour être actif dans la forme intégrée, et peut donc produire des transcrits de l'ORF HBx (Schluter et al. 1994, Shamay et al. 2001). Dans la forme intégrée, l'acide aminé 154 d'HBx est susceptible d'être tronquée d'au moins deux acides aminés, mais des études ont montré que les mutants tronqués (jusqu'à 14 acides aminés) en C-terminal d'HBx sont encore transactivateurs et transcriptionnellement fonctionnels (Kumar et al. 1996) (Voir chapitre HBx pour plus de détails).

L'intégration du génome du VHB semble se produire au début de l'infection. En effet, l'intégration de l'ADN du VHB a été généralement décrite à la fois chez des patients ayant un CHC et chez des patients cirrhotiques atteints de CHB (« Chronic Hepatitis B ») à long-terme (Brecht et al. 1980, Edman et al. 1980, Shafritz et al. 1981, Mason et al. 2010) mais récemment aussi chez des patients atteints de CHB avant l'apparition de dommages hépatiques (Tu et al. 2015, Mason et al. 2016). Une intégration plus précoce de l'ADN du VHB a été également signalée chez des enfants infectés à la naissance, atteints d'une maladie hépatique sévère et chez des patients atteints d'une infection aiguë par le VHB (Kimbi et al. 2005). Ces événements d'intégration ont été aussi observés dans les modèles de la marmotte et du canard quelques jours après l'infection (Yang et al. 1999, Summers et al. 2003). Le caractère précoce

de ce phénomène est une preuve circonstancielle que l'intégration du VHB peut être impliquée dans la modulation de la réplication ou de la persistance du VHB. Il convient donc de s'interroger sur les conséquences cliniques potentielles de ces formes intégrées.

La majorité des études sur l'intégration de l'ADN du VHB, a été axée sur son potentiel dans le développement de CHC. En effet, les premières descriptions de formes intégrées ont été faites dans des tissus de cancer de foie primitif et dans des lignées dérivées de CHC suggérant que l'intégration de l'ADN du VHB serait responsable de la tumorigenèse (Brecht et al. 1980, Edman et al. 1980, Koshy et al. 1981). Différents mécanismes ont ainsi été rapportés : i) la mutagenèse insertionnelle par *cis*-activation de gènes associés au CHC; ii) l'instabilité chromosomique induite par l'intégration et iii) la persistante expression de gènes de VHB de la forme intégrée (Tu et al. 2015).

a) *Pour la cellule hôte*

- Mutagenèse insertionnelle et instabilité chromosomique

Bien que l'intégration se produise de façon aléatoire dans le génome de la cellule hôte, la conservation des éléments « Enhancer » lors de l'intégration suppose une possibilité de *cis*-activation de proto-oncogènes pouvant amener à la sélection clonale de ces hépatocytes et au CHC. Cette possibilité a été confirmée dans le modèle de la marmotte (WHV « Woodchuck hepatitis virus »), où l'insertion se réalise dans 90 % des cas à proximité d'un gène de la famille MYC : *c-Myc*, *N-myc1*, ou plus fréquemment *N-myc2* (Bruni et al. 2004, Jacob et al. 2004). En revanche, pour le VHB chez l'homme, la situation n'est pas aussi claire, plusieurs études ont décrit une intégration à proximité du locus hTERT (« Human telomerase reverse transcriptase ») qui semble être un site privilégié d'intégration du génome du VHB et ce, aussi bien dans les biopsies tumorales humaines que dans la lignée HuH7. La présence de l'Enhancer I du VHB conduit à l'activation du promoteur du gène hTERT et s'accompagne d'une augmentation de l'activité de la télomérase et de la capacité de prolifération cellulaire (Gozaucik et al. 2001, Ferber et al. 2003, Paterlini-Brecht et al. 2003). Une altération de l'expression des gènes tels que MLL4 et CDK15 a également été observée suite à l'intégration (Shera et al. 2001, Jiang et al. 2012). Les intégrations du VHB peuvent également conduire à des fusions de transcrits viraux et humains (éventuellement oncogènes) retrouvées à la fois *in vivo* et *in vitro* (Lau et al. 2014). Par exemple, l'intégration du VHB dans les gènes LINE

(« Long interspersed nuclear element ») de l'hôte entraîne la formation de transcrits de fusion HBV-LINE1, signalés dans 23,3% des CHC. Ce nouveau transcrit serait un long ARN non codant qui active la voie Wnt/ β -catenin, favorisant ainsi le CHC (Lau et al. 2014).

L'altération d'expression d'autres gènes comme la cycline A2, a pu être impliquée dans la carcinogenèse hépatique induite par l'intégration du génome viral (Wang et al. 1990). Dans ce cas, les 152 acides aminés N-terminaux de la cycline A2 (qui contiennent le signal de dégradation) sont substitués par les 156 acides aminés N-terminaux de la protéine MHBs. Cette protéine chimérique est placée sous le contrôle du promoteur viral S conduisant à une surexpression de l'ARNm de la cycline A2. La surexpression de la cycline A2 chimérique serait ainsi associée à une activation des Cyclines dépendantes des kinases (CDK) influant sur la régulation du cycle de division cellulaire. Des expériences complémentaires ont montré que cette protéine chimérique était adressée au réticulum endoplasmique et possédait la capacité de transformer des cellules rénales normales de rat (Wang et al. 1992, Berasain et al. 1998).

Dans le cas du gène codant pour RAR- β (« Retinoic Acid Receptor β »), l'insertion du génome viral conduit à l'expression d'une protéine hybride dans laquelle les 30 acides aminés N-terminaux de la protéine LHBs sont substitués par les 74 acides aminés N-terminaux de la protéine RAR- β . Contrairement à la protéine sauvage, cette forme hybride de RAR- β est capable de transformer des cellules érythroïdes progénitrices aviaires (Dejean et al. 1986, Garcia et al. 1993). L'intégration de l'ADN viral peut également survenir dans l'exon 3 du gène SERCA1 (« Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1 ») conduisant à l'expression d'une protéine chimérique responsable d'un relargage accru de calcium de la mitochondrie vers le cytosol, second messenger impliqué dans la prolifération cellulaire (Chami et al. 2000).

L'intégration du VHB est associée à une instabilité génomique et chromosomique. Plus de la moitié des événements d'intégration ont été localisés dans des régions intergéniques des chromosomes du génome humain et dans des séquences répétées telles que des LINEs, SINEs (« Short interspersed nuclear elements ») ou des répétitions simples (microsatellites) (Yang et al. 2015). Bien que cela reste très variable, les réarrangements et variations de nombre de chromosomes, sont en majorité associés aux CHC induits par le VHB (Jiang et al. 2012, Sung et al. 2012). Par exemple, l'intégration dans des régions S/MAR (« Scaffold/matrix attachment regions ») a été observée dans les CHC chez la marmotte (Bruni et al. 1999, Bruni et al. 2003).

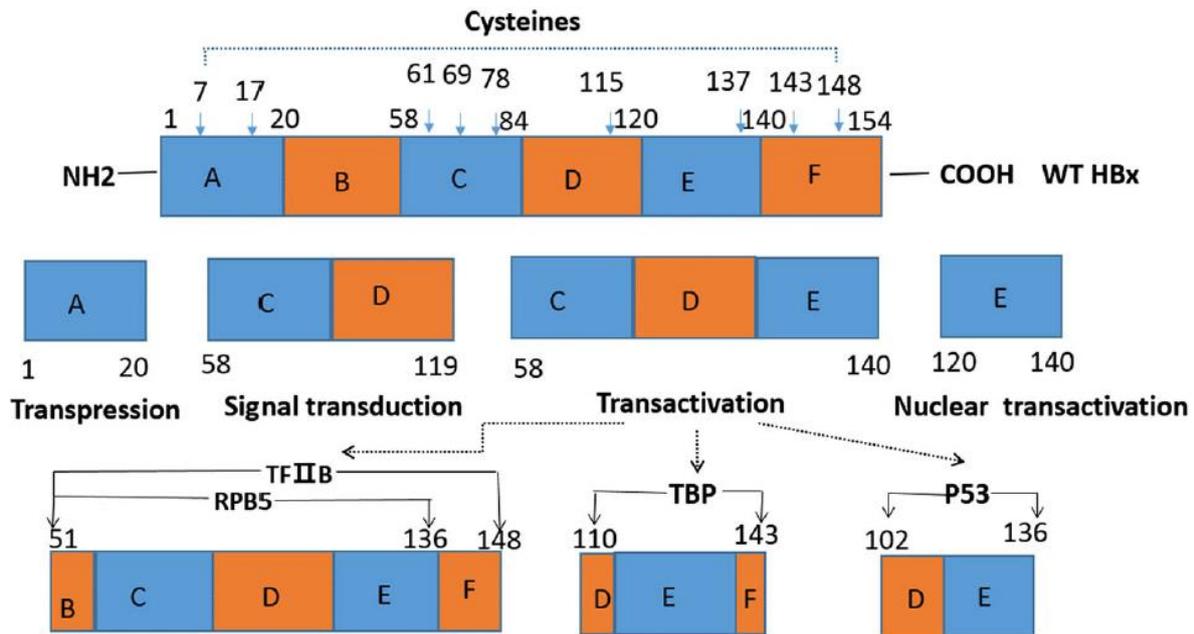
et les lignées cellulaires de CHC humain (Shera et al. 2001), ceci pouvant déréguler l'expression d'oncogènes cellulaires et favoriser la carcinogenèse.

- Expression de gènes de la forme intégrée

Un autre éventuel mécanisme par lequel l'ADN intégré du VHB pourrait conduire au CHC, est la génération et l'expression persistante de protéines VHB mutantes. L'expression des protéines VHB de surface mutées ou tronquées (qui sont connues pour être produites par l'ADN intégré du VHB) sont associées à des réactions de stress du RE et peuvent augmenter le risque de CHC (Wang et al. 2003, Liu et al. 2009). De plus, ces formes mutantes peuvent donner aux hépatocytes un avantage prolifératif et il a été montré qu'elles stimulent l'expansion des hépatocytes (Wang et al. 2003, Su et al. 2008). En effet, la surexpression de ces formes mutantes induit des lésions précancéreuses du foie et le CHC dans des modèles animaux (Chisari et al. 1987, Pasquinelli et al. 1992). Plus encore, la surexpression de la forme HBx tronquée en C-terminal, générée par l'intégration, a été décrite comme induisant des propriétés de cellules souches (Ng et al. 2016), la transformation et l'inhibition de l'apoptose (Tu et al. 2001, Ma et al. 2008) et l'invasion tumorale (Wang et al. 2010, Sze et al. 2013).

b) Pour le virus

Les protéines du VHB exprimées à partir de la forme intégrée peuvent permettre une expression et une persistance des antigènes viraux indépendamment de l'ADNccc. Après l'expansion clonale des hépatocytes, environ 1% des hépatocytes abritent des événements d'intégration détectables (Mason et al. 2010). Même si seulement une minorité d'ADN intégré du VHB exprime des transcrits subgénomiques de type sauvage, ces clones d'hépatocytes pourraient former des réservoirs persistants pour l'expression de l'antigène du VHB. L'expression de protéines virales à partir des formes intégrées, peut par trans-complémentation, favoriser la réplication des formes ayant perdu leur capacité répliquative, comme par exemple des cas des variants épissés du VHB. Bien que, les mutations HBx soient fréquentes dans les formes intégrées de VHB dans le foie chroniquement infecté et dans les tumeurs (Su et al. 1998, Poussin et al. 1999), la protéine HBx fonctionnelle peut également être exprimée à partir de formes intégrées dans certains hépatocytes. Les formes intégrées peuvent également jouer un rôle dans l'échappement de la réponse immunitaire via la modulation de la transcription du VHB.



Tiré de la revue de Sha Fu et collaborateurs, Tumor Biology 2016.

Figure 19 : Structure du domaine de la protéine HBx avec certaines fonctions. Les domaines fonctionnels de la protéine HBx de 154-aa présentés comprennent le domaine de la transpression (aa 1-20), le domaine de transduction du signal (aa 58-119), le domaine de transactivation (aa 58-140) et le domaine de transactivation nucléaire (aa 120-140). Neuf résidus cystéine, indiqués par des flèches bleues, sont cruciaux pour les différentes fonctions de la protéine HBx (aa 7, 17, 61, 69, 78, 115, 137, 143, and 148). Les domaines d'interaction de la protéine HBx avec divers facteurs de transcription tels que TFIIB (aa 51-148), RPB5 (aa 51-136), TBP (aa 110-143), P53 (aa 102-136) sont représentés.

2- Impacts de la variabilité génotypique du VHB

Non seulement les génotypes et les sous-génotypes du VHB sont liés à une répartition géographique, mais les preuves montrent qu'ils sont également associés à la pathogénèse et à l'issue de l'infection par le VHB. Une étude européenne a révélé que par rapport au génotype D, l'infection par le VHB de génotype A, serait associée à un taux significativement plus élevé de rémission soutenue, de clairance de l'ADN viral et de l'AgHBs chez des porteurs chroniques (Sanchez-Tapias et al. 2002). De la même façon, une étude chinoise a également montré que les patients atteints des génotypes A ou B, avaient un taux plus élevé de clairance sérologique de l'AgHBs que les patients infectés par les génotypes C ou D (Yuen et al. 2004). Selon une étude indienne, comparé au génotype A, le génotype D serait associé à des maladies hépatiques plus sévères et à un CHC chez les patients plus jeunes (Thakur et al. 2002). De plus, en Alaska où cinq des dix génotypes du VHB sont présents, une étude a montré que le taux de complications, y compris le développement de CHC, pour les personnes infectées par le génotype A, semble inférieur à celui observé chez les personnes infectées par les génotypes D, C ou F1 (Livingston et al. 2007). La même équipe a observé que la séroconversion de l'AgHBe se produisait beaucoup plus tardivement chez les femmes infectées par le génotype C que chez celles ayant contracté les génotypes A2, B6, D ou F1 (Livingston et al. 2007). Le génotype C serait également associé à une inflammation et à une décompensation hépatique mais aussi à une fibrose, une cirrhose du foie plus importante et augmenterait le risque de développer un CHC (Kao et al. 2004, Chan et al. 2008).

V- Protéine HBx et pathogénicité

A) HBx, une protéine à effet pléiotrope

La protéine HBx du virus de l'hépatite B, est une protéine non structurale très conservée d'environ 16,5 kDa et composée de six domaines fonctionnels nommés de A à F, qui présentent de multiples fonctions à savoir : la transactivation des gènes, la transrépression et la signalisation cellulaire (Fig. 19). HBx est le nom attribué au gène et à la protéine parce que les séquences d'acides aminés de cette protéine du VHB, ne ressemblent à celles d'aucune autre protéine connue (Ali et al. 2014). Neuf résidus cystéine conservés ont été identifiés comme indispensables à la fonction de la protéine HBx. Les régions A à F comportent deux résidus cystéine, la région C en regroupe trois et un résidu dans chacune des régions D et E (Kidd-Ljunggren et al. 1995). Les sites de fixation entre HBx et certains partenaires ont été identifiés,

le domaine nécessaire à la transactivation se trouve entre les acides aminés 52 et 148, les 13 acides aminés C-terminaux étant non indispensables, tandis que les 50 acides aminés N-terminaux ont été montrés comme étant une région régulatrice négative (Murakami et al. 1994).

Différentes études indiquent qu'HBx est une protéine régulatrice multifonctionnelle qui exerce un effet pléiotrope sur plusieurs voies biologiques en interagissant directement ou indirectement avec un grand nombre de protéines. La fonction de transactivation de la protéine HBx a d'abord été postulée en 1981 et l'HBx a été qualifié d'activateur à large spectre de la transcription avec la possibilité de réguler différentes classes de promoteur (Wang et al. 1998). En effet la protéine HBx est capable d'activer de nombreux promoteurs cellulaires dépendants de l'ARN polymérase I, II et III, y compris les promoteurs et enhancers du VHB. La protéine HBx active la transcription de gènes contenant des sites de fixation aux facteurs de transcription du type AP-1 et AP-2 (« Activator protein »), SP1, (« Stable protein »), C/EBP, ATF (« Activating transcription factor »), CREB (« cAMP response element binding protein »), NF- κ B ou NFAT (« Nuclear factor of activated T cells ») activés par le calcium (Lee et al. 2001, Moon et al. 2004, Cougot et al. 2007). La capacité de la protéine HBx d'activer spécifiquement un promoteur dès lors qu'il est présent sous forme épisomale (l'ADNccc ou un plasmide contenant un promoteur et un gène rapporteur), a également été rapporté (van Breugel et al. 2012). De plus, la protéine HBx peut interagir directement avec des composants de la machinerie basale de transcription (TFIIB, TFIIH, RPB5, TBP), avec des facteurs de transcription ou des coactivateurs (CREB/ATF, ATF2, C/EBP- β , ATF3, Oct1, SMAD4, SREBP1) (Qadri et al. 1995, Lee et al. 2001, Moon et al. 2004, Cougot et al. 2007).

Les différents effets biologiques de l'HBx sont étroitement liés à sa localisation. Il a été rapporté que par sa localisation cytoplasmique, la protéine HBx participe à la transduction de signal de nombreuses voies cellulaires telles que les voies de signalisation NF- κ B, Stat et Ras/Raf/Mapk, impliquées dans le développement, l'invasion, la migration et la récurrence du CHC (Chin et al. 2007, Lu et al. 2010). L'HBx est également capable d'induire une augmentation du stress du RE en faveur d'une inflammation hépatique chronique (Cho et al. 2015). Son interaction avec le complexe XAPC7, une sous-unité du protéasome, indique que l'HBx peut réguler la dégradation des protéines via ce processus (Huang et al. 1996, Sirma et al. 1998). De plus, sa localisation mitochondriale est associée à une inhibition des enzymes de la mitochondrie, une augmentation de la production de ROS et de la peroxydation des lipides (Takada et al. 1999, Lee et al. 2004). Plus encore, la protéine HBx induit la transcription du récepteur aux androgènes (AR « Androgen Receptor ») via l'activation de la voie Src (Chiu et al. 2007, Yang

et al. 2009). L'effet de l'HBx sur l'activité transcriptionnelle des AR est fonction de la concentration d'androgène. Cette information est à mettre en rapport avec la prédominance du CHC chez les individus de sexe masculin infectés par le VHB. Enfin, l'activation de Src par la protéine HBx est impliquée dans des activités non dépendantes de sa fonction transcriptionnelle, telle que son effet déstabilisateur des jonctions cellulaires adhérentes (Lara-Pezzi et al. 2001).

Par ailleurs, HBx interagit avec p53 (Feitelson et al. 1993) et via son domaine central (acides aminés 88 à 100) avec DDB1, une sous unité du complexe ubiquitine-E3 ligase Cul4A (Sitterlin et al. 1997, Wentz et al. 2000, Leupin et al. 2005). Dans le noyau, HBx participe à la réplication du VHB et à la persistance virale, en assurant la transcription de tous les gènes viraux à partir de l'ADNccc. De par, son interaction avec les facteurs de transcription de la cellule hôte, la protéine HBx induit la dérégulation des points de contrôle du cycle cellulaire, de la prolifération, de l'apoptose et de la réparation de l'ADN (Benn et al. 1995, Cheng et al. 2010, Liu et al. 2012).

B) HBx, réplication et persistance du VHB

Les premières observations stipulant le rôle de la protéine HBx dans la réplication du VHB, sont le fait qu'HBx co-précipite avec le complexe de réplication, est co-marqué avec la protéine core et retrouvé dans le sérum de porteurs chroniques forts répliqueurs (Feitelson et al. 1990, Horiike et al. 1991). Ces observations ont été renforcées par des données montrant qu'HBx favorise l'expression de gènes viraux et la réplication en stimulant les enhanceurs et promoteurs du VHB (Colgrove et al. 1989). Des études indépendantes chez la marmotte avec le WHV (« Woodchuck hepatitis virus ») déficient en HBx, ont ensuite démontré que la protéine HBx est essentielle à la réplication virale (Chen et al. 1993). De plus, des souris injectées par voie hydrodynamique avec un ADN VHB déficient en HBx présentent une réplication faible du VHB (Keasler et al. 2007) tandis que la réexpression de l'HBx par transcomplémentation, restaure la réplication virale avec une virémie identique à celle du VHB sauvage. La protéine HBx est également capable d'induire l'expression de la protéine core dans les souris transgéniques (Reifenberg et al. 1999). D'autres études ont démontré que l'HBx initie et maintient la réplication du VHB dans les hépatocytes primaires humains (Lucifora et al. 2011). Ainsi, cette protéine favorise la maintenance de l'état de portage chronique, par stimulation permanente de l'expression de gènes viraux et de la réplication du VHB par différents

mécanismes. Par exemple, l'HBx inhibe partiellement la capacité du protéasome à dégrader des protéines (Hu et al. 1999). En effet, l'inhibition du protéasome par des drogues, n'a aucun effet sur les VHB et WHV sauvages *in vitro* mais reverse complètement le défaut de réplication observé avec les VHB et WHV déficients pour la protéine HBx, suggérant ainsi que l'interaction entre l'HBx et le protéasome favorise la réplication du VHB (Zhang et al. 2004). Cependant, l'expression et la réplication des gènes de VHB dépendent d'un niveau constant d'HBx dans la cellule infectée car il a été rapporté que deux protéines chaperones Hdj1 et hTid1, de la famille des Hsp40/DnaJ, en favorisant la dégradation de HBx et du core, suppriment la réplication du VHB (Sohn et al. 2006). De plus, l'hépatocystine, une chaperonne associée au RE, impliquée dans la détection du calcium intracellulaire, dans la régulation du métabolisme du glucose et dans la signalisation du récepteur au FGF, se lie à HBx et induit sa dégradation via le protéasome atténuant ainsi la réplication du VHB (Shin et al. 2013). En revanche, l'interaction d'HBx avec le DDB1 (« DNA damage binding protein 1 ») de la cellule hôte, favorise non seulement des dommages à l'ADN et la carcinogénèse mais stimule également la réplication virale (Leupin et al. 2005). HBx interagit également avec une autre protéine (UVDDDB) qui se lie à l'ADN endommagé et participe à la réparation par excision de nucléotides (NER). Une étude de l'équipe de Transy, a montré que l'interaction entre le WHx et UVDDDB-p127 est indispensable pour la réplication du WHV chez la marmotte (Sitterlin et al. 2000) indiquant encore une fois que la localisation nucléaire de l'HBx est associée à la réplication du VHB. Ainsi, la capacité d'HBx à fonctionner en tant que transactivateur dépend de ses partenaires cellulaires et le génome viral semble être l'une de ses matrices majeures pour la transactivation (Gong et al. 2013).

Dans le noyau de la cellule infectée, la protéine HBx est recrutée sur le minichromosome d'ADNccc avec les protéines cellulaires telles que les histones acétyltransférases, la CBP (« CREB-binding protein »), la p300 et les histones déacétylases (HDAC1 et hSirt1) suggérant que la réplication du VHB est régulée par l'HBx via des modifications épigénétiques (Belloni et al. 2009). L'HBx augmente également la méthylation, la phosphorylation et l'acétylation de l'histone H3 liée à l'ADNccc indiquant que l'HBx régule l'expression des gènes viraux par remodelage de la chromatine (Luo et al. 2013). Ainsi, l'équipe de Neuveut a démontré que la suppression de la protéine cellulaire PRMT1 (« Protein arginine N-methyltransferase 1 »), inhibe la transcription de l'ADNccc et qu'en supprimant l'expression de PRMT1, la protéine HBx stimule la transcription des gènes viraux (Benhenda et al. 2013). De plus, la même équipe a identifié un autre partenaire cellulaire SETDB1, réprimé par l'HBx (Riviere et al. 2015). En

effet, SETDB1 est une histone méthyltransférase responsable de la méthylation répressive de l'histone H3K9me3. L'équipe a démontré dans les hépatocytes primaires humains et dans la lignée cellulaire HepaRG, que la méthylation de H3K9me3 recruté sur l'ADNccc est augmentée lors d'une infection avec du VHB (X-) par rapport au VHB sauvage et que cette méthylation de H3K9me3 est significativement réduite lorsque SETDB1 est déplété, ceci associé à une restauration partielle de la transcription du VHB (X-). Plus récemment, l'équipe de Strubin a démontré d'une part que, l'HBx transactive l'expression de gènes principalement de l'ADN épisomal comme l'ADNccc (van Breugel et al. 2012) et d'autre part que, cette induction par HBx se faisait par la dégradation via le protéasome, de facteurs de répression cellulaires tels que Smc5/6 (Decorsiere et al. 2016). L'équipe de Linshan Su a effectué les mêmes observations *in vitro* et *in vivo* (Murphy et al. 2016).

L'une des questions majeures découlant des récentes études sur l'HBx, est de savoir comment est régulée l'expression de l'HBx par rapport à son effet inhibiteur de la répression transcriptionnelle de l'ADNccc induite par les facteurs de la cellule hôte. Différentes hypothèses peuvent être émises : soit la protéine ou l'ARN de l'HBx sont présents dans la particule virale au moment de l'infection soit l'HBx provient de particules virales ayant eu un défaut de rétrotranscription de l'ARNpg en ADNrc. De façon intéressante, une étude récente de l'équipe de Lu a rapporté la présence d'ARN VHB dans les sérums de porteurs chronique B et a démontré que ces ARN viraux sont principalement de l'ARNpg (Wang et al. 2016). De plus, l'équipe de Fletcher, par une approche de séquençage de l'ARN (RNA-seq), a observé d'une part que les transcrits HBx sont les seuls présents 24 heures post-infection et d'autre part que les inocula de VHB issus de culture cellulaire ou de sérum de porteurs chroniques B, contiennent des ARN HBx (Niu et al. 2017).

Par ailleurs, il a été rapporté que l'activation de la kinase Src par HBx, joue un rôle dans la réplication du VHB, notamment en stimulant l'activité de la polymérase virale (Klein et al. 1999). De plus, il a été montré que l'HBx stimulait la phosphorylation de la protéine HBc, ce qui est lié à une augmentation de l'activité de la polymérase (Melegari et al. 2005). La protéine HBx n'interagit pas directement avec la kinase Src, mais agit plutôt sur des facteurs en amont, et notamment sur la kinase FAK (« Focal adhesion kinase ») et Pyk2 (« Proline-rich tyrosine kinase ») en modulant le calcium cytosolique (Bouchard et al. 2003 , Bouchard et al. 2006). Plusieurs études ont également rapporté une augmentation du calcium intracytoplasmique en présence de la protéine HBx (Bouchard et al. 2001 , Chami et al. 2003 , McClain et al. 2007). La dérégulation de la signalisation calcique dans les cellules exprimant HBx est due à la fois à

une réduction de l'import de calcium dans la mitochondrie, et à l'inactivation de PMCA (« Plasma membrane calcium ATPase ») (Chami et al. 2003). Le rôle du calcium comme intermédiaire des activités de l'HBx a été confirmé aussi bien pour les voies MAPK que pour l'activation de certains facteurs de transcription comme NFAT. L'activation de NFAT par la protéine HBx se traduit par la déphosphorylation et la translocation nucléaire de NFAT par un mécanisme calcium/calcineurine dépendant augmentant ainsi son activité transcriptionnelle (Carretero et al. 2002 , Lara-Pezzi et al. 2002 , Yue et al. 2011). L'importance de la signalisation calcique pour la réplication virale a été confirmée, en effet, bien que des agents mobilisateurs de calcium peuvent restaurer partiellement la réplication d'ADN de VHB défectifs pour l'HBx, ces molécules n'augmentent pas l'activité polymérase de façon aussi importante qu'en présence de l'HBx. Ainsi, on ne sait pas si ces agents augmentent l'encapsidation de l'ARNpg, ce qui pourrait compenser la diminution d'activité de la polymérase en absence d'HBx, puisque ces agents peuvent augmenter l'assemblage des capsides (Choi et al. 2005 , Gearhart et al. 2010).

Enfin, la protéine HBx peut également stimuler la réplication virale en activant la voie de l'autophagie (Sir et al. 2010). L'autophagie est un processus par lequel une cellule digère les macromolécules et les organelles durant une période de carence afin de recycler les composants des voies de biosynthèse et de production d'énergie. Pour le VHB, l'autophagie n'entraîne pas une augmentation du taux de dégradation des protéines autophagiques. L'HBx se lie et active plutôt, la PI3-K (« Phosphatidylinositol 3-kinase »), ce qui augmente la replication du VHB (Sir et al. 2010). L'HBx déclenche également l'autophagie dans les hépatocytes immortalisés (Mao et al. 2011), conduisant de façon importante à la survie cellulaire.

Les différentes études sur l'HBx, montrent clairement que cette protéine virale détourne de nombreuses voies et processus cellulaires en faveur de l'expression de gènes viraux et de la réplication du VHB conduisant à une persistance virale et au développement d'une maladie chronique, facteur de risque pour le développement du CHC.

C) HBx et carcinogenèse hépatique

1- Impacts des mutants naturels de la protéine HBx

a) Mutations ponctuelles

La région EnhII/BCP est un « Hot spot » dans laquelle, différents types de mutation très fréquemment rencontrés affectent l'HBx. La double mutation BCP A1762T/G1764A

conduisant à deux changements d'acides aminés dans la protéine HBx, K130M et V131I, est la mutation du VHB la plus fréquemment rapportée par différentes études comme associée à un risque de CHC (Datta et al. 2008, Zhu et al. 2010, Jang et al. 2012, Chen et al. 2014). Bien que, le rôle exact de cette double mutation dans l'hépatocarcinogénèse soit encore inconnu, ces mutations peuvent entraîner une diminution importante de l'expression de l'AgHBe tout en améliorant la réplication du VHB, contribuant ainsi à la progression de la maladie hépatique (Buckwold et al. 1996, Hakami et al. 2013). De plus, cette double mutation induirait une réduction de l'expression de p21 provoquant une prolifération incontrôlée des cellules (Kwun et al. 2004) et serait beaucoup plus fréquente chez les individus infectés par le VHB de génotype C (Yang et al. 2016).

La seconde mutation ponctuelle associée au CHC est la mutation T1753V. Cette dernière associée à une substitution d'acides aminés I127L/T/N/S, peut changer l'affinité entre l'HBx et Bcl2 affectant ainsi l'apoptose induite par la protéine HBx (Geng et al. 2012).

Une autre mutation ponctuelle induisant un changement d'acide aminé H94Y dans l'HBx, est la mutation C1653T. Elle se situant dans une région appelée CURS (« Core upstream regulatory sequence »), un élément d'activation fort du promoteur EnhII/core, peut augmenter l'activité du promoteur EnhII/core (Lopez-Cabrera et al. 1990, Yuh et al. 1992). La mutation C1653T a récemment été signalée comme facteur prédictif de CHC au Japon (Kaneko et al. 1995, Uchida et al. 1997).

Enfin, des mutations affectant la région régulatrice répressive de la protéine HBx, ont été rapportées dans une cohorte koréenne (Kim et al. 2008). La mutation A1383T ne cause pas de changement d'acides aminés dans la protéine HBx mais réduit la capacité des suppresseurs de tumeur, miR15a/16 à se lier à l'HBx (Liu et al. 2013), favorisant donc l'échappement des cellules infectées à l'apoptose. La mutation G1386A/C induit un changement d'acide aminé V5M/L de la protéine HBx (Kim et al. 2008). Elles caractériseraient la progression de la cirrhose vers le CHC (Kim et al. 2008). Quant à la mutation C1485T, elle induit un changement d'acide aminé P38S de la protéine HBx et participerait à l'échappement du VHB à la réponse humorale (Li et al. 2015).

b) Mutants délétés en C-terminal

Comme décrit dans les précédents chapitres, l'expression de la protéine HBx peut être conservée après l'intégration du génome du VHB dans celui de la cellule hôte. La région C-

terminale de la protéine HBx est essentielle à sa capacité de transactivation, et dans le contrôle de la prolifération et la viabilité cellulaire. De façon surprenante, les séquences HBx isolées des tumeurs de patients, présentent de manière très fréquente une délétion dans la région distale du gène X (Tu et al. 2001, Liu et al. 2008). De plus, des formes tronquées en C-terminal d'HBx ont été rapportées au cours de l'hépatite chronique active, suggérant que la troncation peut être sélectionnée au cours du processus de carcinogenèse hépatique (Liu et al. 2008).

Il est cependant, intéressant de s'interroger sur la raison de la conservation de ces séquences au sein des tumeurs, alors que celles-ci ne sont plus capables d'activer la réplication virale. En effet, l'absence de réplication virale dans la plupart des tumeurs suggère aussi que la capacité d'activation de la réplication virale de la protéine HBx n'est plus indispensable et qu'au contraire l'expression des formes tronquées de l'HBx, entraîne un avantage sélectif de l'hépatocyte puisque ces formes n'ont plus d'effet anti-prolifératif, ni d'effet pro-apoptotique sur des cellules d'hépatomes (Sirma et al. 1999 , Ma et al. 2008). De plus, les études *in vitro* indiquent que la troncation permet à la protéine HBx d'augmenter sa capacité de potentialiser la transformation cellulaire (Tu et al. 2001 , Ma et al. 2008) notamment en coopération avec les oncogènes Ras et Myc. Récemment, notre équipe a montré dans le modèle de CHC induit par le DEN, que les souris transgéniques exprimant la forme tronquée d'HBx (délétion de 18 acides aminés en C-terminale) ont un développement de CHC plus précoce par rapport aux souris transgéniques FL-HBx (forme non tronquée), ayant elles-même, un développement tumoral plus rapide que les souris sauvages (Quetier et al. 2015). Ceci est associé à une augmentation du niveau moyen de l'inflammation hépatique (Quetier et al. 2015).

Il faut toutefois noter que l'effet biologique dépend de la taille de la délétion du gène X. Il a été montré qu'un mutant délété de 40 acides aminés aurait, au contraire d'un mutant délété de 30 acides aminés, la capacité de réprimer l'expression de Wnt-5a entraînant la dégradation de la β -Caténine, et serait ainsi pro-tumorigène (Liu et al. 2008). Comme des études de CHIP le suggèrent, les formes tronquées de la protéine HBx pourraient aussi réprimer l'activité des micro-ARN, directement en interagissant avec leur promoteur, en particulier miR-26a, impliqué dans la carcinogenèse (Yip et al. 2011). Ces données indiquent que les formes tronquées de la protéine HBx sont capables de transformer des cellules immortalisées et qu'elles joueraient un rôle majeur dans l'hépatocarcinogenèse liée au VHB (Quetier et al. 2015 , Lee et al. 2016, Ching et al. 2017).

2- HBx et hépatite chronique B

a) Régulation métabolique et maladie chronique

- HBx et réponse immunitaire

Plusieurs données de la littérature indiquent que la protéine HBx participe à la mise en place d'une CHB en inhibant la réponse immunitaire innée. Par exemple, l'HBx induit la dégradation des protéines MAVS (« Mitochondrial antiviral-signaling ») conduisant à une baisse de production d'IFN- β et à une faible induction des ISG (« IFN-stimulated genes ») (Wei et al. 2010). De plus, des études récentes ont montré que l'HBx peut induire via le protéasome, la dégradation de TRIF (« TIR-domain-containing adaptor inducing interferon- β ») atténuant ainsi la voie de signalisation du TLR3 et inhibe la production d'IFN- β en se fixant aux IPS-1 (IFN- β promoter stimulator 1) (Kumar et al. 2011, Hong et al. 2015). Cependant, la protéine HBx régule aussi à la hausse les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-23, nécessaire à l'expansion clonale des lymphocytes Th17, la Cox-2 (« Cyclo-oxygénase 2 »), la prostaglandine E2 (Yue et al. 2011) et l'IL-32 (Pan et al. 2011), l'IL-18 (Lee et al. 2002). Ainsi, en dérégulant la réponse immunitaire, la protéine HBx favorise non seulement la persistance virale mais également des dommages hépatiques. Il a été également rapporté que le TNF- α et l'IL-6 sécrétés par les cellules inflammatoires, stimulent l'HBx (Ohno et al. 1997). En effet, le TNF- α stabilise la protéine HBx (Shukla et al. 2011) et cette dernière augmente l'expression de TNF- α (Lara-Pezzi et al. 1998) suggérant une boucle de rétrocontrôle positive par laquelle l'HBx favorise l'inflammation chronique. Ce même mécanisme a été observé entre la protéine HBx et les ROS (Meyer et al. 1992). Bien que l'HBx augmente l'expression de TNF- α , la protéine HBx protège également les cellules infectées de l'apoptose induite par le TNF- α , en activant les voies NF- κ B, PI3-K et β -caténine et en inhibant les caspases 3 et 8 (Pan et al. 2007). Par l'inactivation de ces deux caspases, la protéine HBx bloque la destruction des hépatocytes infectés médiée par les lymphocytes T cytotoxiques (Pan et al. 2001). En échappant à la mort induite par les cellules immunitaires, les cellules infectées ont un avantage de survie et de croissance par rapport aux cellules saines après chaque atteinte hépatique. Ainsi, au fil du temps, le foie accumule une fraction de plus en plus importante d'hépatocytes exprimant l'HBx (Wang et al. 1991). Par exemple, il a été rapporté que l'activation de la voie NF- κ B induite par la boucle HBx/TNF- α participe au développement de la stéatose hépatique chez des porteurs chroniques (Kim et al. 2010). De plus, l'équipe de Cheong a rapporté que la surexpression de l'HBx induit une accumulation de lipides dans les lignées cellulaires Chang, HepG2 et dans les

souris transgéniques HBx. Cette dérégulation du métabolisme lipidique par la protéine HBx, serait médiée par SREBP1 (« Sterol regulatory element binding protein 1 ») et PPAR γ (Kim et al. 2007).

- HBx et survie au cours de la prolifération cellulaire

La protéine HBx peut également favoriser la survie cellulaire, en activant l'autophagie. En effet, dans des conditions de carence ou de nutriments limités, comme observées dans la cirrhose, l'HBx transactive le gène de la Becline 1 (Tang et al. 2009) impliqué dans l'autophagie. Ceci conduit à l'inhibition des caspases 3 et 9, et au blocage de la libération du cytochrome C et AIF (« Apoptosis-inducing factor ») (Tang et al. 2005, Kuo et al. 2012). Cependant, dans certaines conditions et en fonction des partenaires cellulaires avec lesquels elle interagit, la protéine HBx peut induire de l'apoptose. Par exemple, l'expression de l'HBx dans différentes lignées cellulaires conduit à l'apoptose (Pollicino et al. 1998, Shintani et al. 1999). La protéine HBx sensibilise les fibroblastes de souris exposés aux agents endommageant l'ADN, à l'apoptose médiée par la voie p53 (Chirillo et al. 1997). La protéine HBx inhibe la croissance des cellules NIH3T3 en soft agar en induisant leur apoptose et celle des cellules Chang cultivées dans un milieu avec 1% de sérum (Kim et al. 1998) ou traitées au TNF- α (Su et al. 1997). Dans ce dernier cas, la sensibilité accrue au TNF- α est associée à une stimulation prolongée de N-myc et de la voie MEKK1 (« stress-mediated mitogen activated-protein kinase 1 »). Comme autres mécanismes, l'HBx est capable d'induire la translocation mitochondriale de la protéine pro-apoptotique Bax (Kim et al. 2008), ce qui pourrait conduire à une inhibition de la croissance tumorale (Kuo et al. 2008). Par exemple, lors de processus prolifératifs, l'expression de l'HBx induit un arrêt de croissance ou de l'apoptose. Ceci a été observé chez des souris transgéniques HBx après une hépatectomie partielle, où les animaux ont présentés un défaut de régénération hépatique (Tralhao et al. 2002). D'autres études ont suggéré que l'activité inhibitrice serait liée à des facteurs contenus dans le sérum des souris transgéniques HBx. L'un des candidats potentiels est le TGF- β 1, connu pour ces effets anti-prolifératifs mais des travaux ont montré que sa concentration sérique demeure inchangée dans les souris transgéniques HBx après hépatectomie partielle (Tralhao et al. 2002). De façon intéressante, une étude menée par notre équipe, a révélé que le retard de régénération observé dans les souris transgéniques HBx après hépatectomie partielle, est lié à une surexpression de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 médiée par la voie p38 MAPK (Quetier et al. 2013). De plus, cette étude a également montré une

corrélation entre la production excessive d'IL-6 et l'altération de la transition G1/S dans les souris transgéniques HBx.

Beaucoup d'études se sont intéressées à l'effet de la protéine HBx sur le cycle cellulaire. Il a été montré que l'impact de la protéine HBx sur la progression du cycle cellulaire était dépendant du type cellulaire (hépatocyte normal versus tumoral), ainsi que des conditions expérimentales et notamment du niveau d'expression de la protéine HBx. Ainsi, des études ont montré que la protéine HBx peut induire l'expression de p21 et p27 ce qui a pour conséquence d'arrêter les cellules en transition G1/S (Qiao et al. 2001). De plus, l'équipe de Bouchard a montré dans des hépatocytes de rat en culture primaire, que la protéine HBx entraînait la sortie des hépatocytes de la phase G0 vers la phase G1 du cycle cellulaire ; suivi d'un blocage en G1. La progression en G1 serait liée à la diminution de l'expression des protéines p15 et p16, des inhibiteurs de la progression de la phase G1, et à l'augmentation des cyclines D1 et E alors que l'arrêt en fin de G1 serait dû à l'augmentation de p21. Cette entrée en G1, associée à l'absence de progression en phase S, servirait à la réplication du VHB indiquant que la réplication virale était favorisée en G1 par rapport en G0. Plus encore, ces modulations seraient liées à l'augmentation du calcium cytosolique par l'HBx (Gearhart et al. 2010). Les modulations des protéines du cycle par l'HBx ont été confirmées par la même équipe dans des hépatocytes primaires humains en culture (Gearhart et al. 2011). En revanche, d'autres études rapportent que l'expression de la protéine HBx entraîne une déstabilisation de p27, responsable de la promotion de la transition G1/S (Mukherji et al. 2007). D'autres travaux ont également rapporté une répression de p21 causée par l'HBx, ce qui accélérerait la croissance cellulaire (Kwun et al. 2004, Noh et al. 2004). De plus, dans la lignée d'hépatome HepG2 exprimant l'HBx, il a été montré que la progression du cycle cellulaire pouvait être induite par la régulation de la galactosyl-transférase (Wei et al. 2008).

b) HBx et fibrose hépatique

La protéine HBx participe également à la fibrogenèse hépatique en régulant à la hausse l'expression de TGF- β 1 (Yoo et al. 1996), une cytokine fortement fibrogénique qui agit comme promoteur tumoral dans un contexte d'hépatite chronique B. Il a été rapporté dans des lignées d'hépatome, que la protéine HBx induit l'expression de fibronectine (Norton et al. 2004) et augmente l'activité transcriptionnelle de TGF- β 1 en stabilisant et favorisant la translocation nucléaire de Smad4 (Lee et al. 2001). En effet, l'activation des voies Ras, Src, PI3-K et de NF- κ B par l'HBx, contrecarre l'effet anti-prolifératif médié par le TGF- β ; favorisant la

prolifération, la production de la MEC, l'angiogenèse et la résistance aux médicaments (Shih et al. 2003). Bien qu'une infection des HSC par le VHB n'ait été rapportée, des études *in vitro* ont montré que l'HBx active les HSC humains en induisant la surexpression d' α -sma, de TGF- β 1, du récepteur II au TGF- β , du CTGF (« Connective tissue growth factor ») et du collagène (Guo et al. 2009). Une autre étude a rapporté que les hépatocytes exprimant l'HBx, activent les HSC par un mécanisme paracrine (Martin-Vilchez et al. 2008). Cette étude montre une rupture et un remodelage de la MEC favorisés par la production de MMP (« Metalloproteinases ») et de TIMP (« Tissue inhibitors of metalloproteinases ») (Han 2006).

Par ailleurs, le rôle de la protéine HBx dans l'induction de l'EMT (« Epithelial to mesenchymal transition ») a été rapporté dans les lignées d'hépatome humain (Shin Kim et al. 2016). De plus, l'activation de la voie Stat5b par l'HBx, corrèle avec l'EMT dans les biopsies tumorales (Lee et al. 2006). En effet, l'une des caractéristiques de l'EMT, est la perte de l'expression de la cadhérine E (Cdh1). Ainsi, la protéine HBx inhibe l'expression de Cdh1 en méthylant son promoteur. De plus, il a été rapporté que la stabilisation de Snail (suppresseur de Cdh1), l'inhibition de miR-373 (activateur de Cdh1) et l'activation des voies de signalisation PI3-K/AKT/GSK-3 β , sont les différentes stratégies employées par HBx pour favoriser la perte de l'intégrité du tissu hépatique et la progression vers une atteinte hépatique plus sévère (Lee et al. 2005, Arzumanyan et al. 2012).

La progression vers la cirrhose est marquée par une prolifération active des hépatocytes associée à une altération de l'architecture hépatique et à une hypoxie du foie. En réponse à cela, la cellule induit l'expression de HIF1 (« Hypoxia inducible factor 1 »). HIF1 est un facteur de transcription puissant qui favorise la survie cellulaire en induisant une angiogenèse par surexpression de VEGF (« Vascular endothelial growth factors ») et d'autres facteurs tels que l'angiopoïétine-2 (Folkman 1995). Une étude a montré, qu'HBx transactive fortement l'expression de HDAC1 qui interagit et stabilise HIF1 par déacétylation (Yoo et al. 2008) favorisant l'adaptation des cellules exprimant HBx à l'hypoxie. Dans un foie hypoxique, la protéine HBx stimule fortement l'expression de HIF1 (Lee et al. 2000) via l'activation d'ERK (Yoo et al. 2003). Ces événements conduisent à une activation accrue de VEGF (Lee et al. 2000) et de l'angiopoïétine-2 (Sanz-Cameno et al. 2006), ce qui stimule l'angiogenèse dans les cellules cancéreuses naissantes.

3- Impacts de la protéine HBx dans le développement du CHC

Bien qu'aucune des nombreuses hypothèses proposées jusqu'à présent ne permet de concilier à elle seule l'ensemble des observations et donc de donner un mécanisme unique de carcinogenèse hépatique liée au VHB, le rôle essentiel de la protéine HBx pour la biologie du virus, sa conservation fréquente jusqu'aux stades tumoraux et les voies majeures de carcinogenèse modulées par l'HBx laissent penser que son impact dans le développement du CHC est important. Ainsi, la protéine HBx agirait comme un cofacteur dans la carcinogenèse hépatique en modulant les régulateurs épigénétiques, les voies de réparation de l'ADN et le cycle cellulaire.

a) HBx et méthylation/acétylation

La localisation nucléaire de la protéine HBx lui permet de stimuler ou de bloquer l'expression de certains gènes via des régulations épigénétiques (Tian et al. 2013). Par exemple, HBx transactive les DNMT1 et DNMT3A (« DNA methyl-transferases »). En effet, les DNMT transfèrent des groupes méthyle d'une S-adénosyle-méthionine à la cytosine des motifs CpG en 5' pour former une méthyl-cytosine (Tian et al. 2013) conduisant à la suppression de l'expression des gènes (Park et al. 2007). Différentes études ont rapporté que l'HBx induit la méthylation de gènes codant pour des protéines régulant négativement la croissance cellulaire telles que p16, la cadhérine E, la glutathion S-tranféroase P1 et l'IGFBP (« Insulin-like growth factor-binding protein ») (Lee et al. 2005 , Park et al. 2007 , Zhu et al. 2010). D'autre part, la protéine HBx induit l'activation de gènes codant pour des facteurs favorisant la croissance des cellules tels que les ALDH (regroupant « Retinal dehydrogenase 1 », « Plasma retinolbinding protein precursor », « Cellular retinol-binding protein 1 ») et la cadhérine 6 par hypométhylation de leur promoteur (Zheng et al. 2009). D'autres données montrent que l'HBx transactive aussi l'oncogène C-myc via la surexpression des histones méthyl-tranféroases (Hamamoto et al. 2006 , Yang et al. 2009). Il a été rapporté que la protéine HBx modifie également l'expression des gènes cellulaires en altérant l'acétylation des résidus lysine des histones, ce qui conduit à l'activation de gènes cibles comme l'IL-8 (Pollicino et al. 2013) et PCNA (« Proliferating cell nuclear antigen ») (Cougot et al. 2007). L'IL-8 favorise la mitose, la mobilité cellulaire et l'angiogenèse alors que PCNA participe à la réplication de l'ADN.

b) HBx et ARN non codants

La protéine HBx participe également au développement du CHC en dérégulant l'expression d'une multitude d'ARN non codants (Zhang et al. 2017). En effet, plus de 90% du génome humain sont transcrits en ARN non codants (ARNnc). Des études récentes ont rapporté que ces ARNnc regroupent deux membres importants, les micro-ARN (miRNA) et les ARN longs non codants (ARNlnc), qui sont responsables de la régulation pré/post-transcriptionnelle des gènes. Par exemple, la protéine HBx réduit fortement l'expression de plusieurs miRNA de la famille Let-7 connue comme suppresseur de tumeur. Ceci conduit à une surexpression de Stat3, Ras, et Myc (Wang et al. 2010). La surexpression de TGF- β induite par l'HBx, entraîne l'activation de l'expression de miR-21, un inhibiteur de PDCD4 (« Programmed cell death 4 ») (Qiu et al. 2013). PDCD4 a pour rôle l'inhibition des voies de signalisation favorisant la croissance cellulaire, la surexpression de la cadhérine E et bloquant la voie β -caténine (Lankat-Buttgereit et al. 2009). L'induction des miR-29a et miR-148a par la protéine HBx, entraîne l'inactivation de PTEN (« Phosphatase and tensin homolog »), ce qui favorise la croissance et la métastase (Kong et al. 2011, Yuan et al. 2012). En induisant la surexpression de miR-221, la protéine HBx inhibe l'expression du récepteur α à l'estrogène, connu pour être un facteur protecteur contre le CHC, (Liu et al. 2015). De plus, la protéine HBx peut accélérer la lipogenèse en augmentant l'expression des ACSL1/4 (« Acyl-CoA synthetase ») via l'inhibition de l'expression de miR-205 (Cui et al. 2014, Cui et al. 2014). Enfin, en diminuant l'expression de miR-145, l'HBx peut déréguler le cycle cellulaire (Gao et al. 2015). Plus encore, une étude récente a démontré que la protéine HBx peut également altérer l'expression des facteurs tels que DGCR8 (« DiGeorge critical region 8 »), impliqués dans le « Processing » des miRNA (Shan et al. 2015).

En ce qui concerne les ARNlnc, une étude a rapporté que par une activation des voies ERK/p38/JNK, la protéine HBx peut induire l'expression de DBH-AS1 (Huang et al. 2015). DBH-AS1 est un ARNlnc d'environ 2 kb qui induit la prolifération cellulaire aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* et il a été montré que son expression accélère les transitions G1/S et G2/M. Par ailleurs, une expression très élevée de l'ARNlnc HULC (« Highly upregulated in liver cancer ») a été observée dans les CHC humains. La surexpression de HULC induite par l'HBx, entraîne une prolifération cellulaire non contrôlée via l'inhibition du suppresseur de tumeur p18 (Du et al. 2012). En revanche, l'expression de l'ARNlnc Dreh (« HBx downregulated lncRNA ») est réduite dans le foie des souris transgéniques HBx. Dreh est un inhibiteur de métastase contrôlant l'expression de la vimentine, une protéine du cytosquelette surexprimée dans l'EMT (Huang et

al. 2013). De façon intéressante, une étude récente a montré que l'ARN issu de la fusion d'HBx avec les LINE (« Long interspersed nuclear elements »), peut fonctionner comme un ARNlnc. Les LINE sont des rétrotransposons (séquences répétées) qui représentent 17% du génome humain. Des études ont montré l'existence d'une séquence LINE1, co-transcrite du chromosome 8p11 avec une insertion de l'HBx dans quatre lignées cellulaires de CHC. Ce transcrit présente les fonctions d'un ARNlnc et induit la translocation nucléaire de la β -catéline (Lau et al. 2014).

c) HBx et instabilité génétique

L'une des caractéristiques majeure d'un cancer est l'instabilité génétique favorisée par des événements d'aneuploïdie. Au cours de la prolifération, grâce à son interaction avec la protéine cellulaire HBXIP, la protéine HBx peut provoquer une amplification des centrosomes et la formation de fuseaux mitotiques multipolaires, entraînant des défauts de ségrégation chromosomique et une instabilité génétique (Fujii et al. 2006). Par ailleurs, HBx possède un signal d'exportation nucléaire qui interagit avec le récepteur d'exportation nucléaire Crm1. La protéine Crm1 est associée à la translocation nucléaire de nombreuses protéines de signalisation telles que NF- κ B, Mdm2 et MAPKK qui favorisent la survie et la croissance cellulaire (Forgues et al. 2001). Une étude a rapporté que les complexes HBx/Crm1 sont associés à de l'aneuploïdie dans un foie préneoplasique et à des anomalies de centrosomes dans les cellules en mitose (Forgues et al. 2003). Comme évoqué ci-dessus, HBx participe également à l'instabilité génétique en dérégulant par différentes stratégies, les voies de réparation de l'ADN (Matsuda et al. 2009). En effet, les cellules soumises à diverses conditions de stress (infection avec des virus oncogènes, exposition à des carcinogènes chimiques, des radiations ou à l'hypoxie) émettent une réponse au stress caractérisée par la surexpression du suppresseur de tumeur, p53. La protéine p53 est stabilisée par phosphorylation ce qui empêche sa dégradation par Mdm2 (« Mouse double minute 2 »). Différentes études ont rapporté que la protéine HBx se lie et séquestre p53 dans le cytoplasme (Ueda et al. 1995), inhibe sa fonction de suppresseur de tumeur, bloque sa fonction dans le NER (« Nucleotides excision repair ») (Mathonnet et al. 2004) et dans l'apoptose (Wang et al. 1995), compromettant ainsi l'intégrité génétique. La protéine HBx peut également déréguler la réponse aux dommages à l'ADN indépendamment de la voie p53, en se liant aux protéines DDB (« DNA damage-binding ») (Becker et al. 1998, Groisman et al. 1999). Enfin, la formation de centrosomes surnuméraires, des fuseaux multipolaires et des cellules multinucléées serait liée à l'activation constitutive de la

signalisation Ras par l'HBx (Forgues et al. 2001, Forgues et al. 2003). L'observation selon laquelle la protéine HBx contrecarre la sénescence induite par Ras dans les cellules humaines immortalisées (Oishi et al. 2007) suggère également que les mécanismes naturels de défense protégeant les cellules contre les erreurs mitotiques et l'instabilité génétique sont compromis par l'HBx. Ainsi, bien que la protéine HBx ne soit pas un mutagène, elle favorise le développement et la propagation de mutations.

d) HBx et cycle cellulaire

Le rôle de la protéine HBx dans le cycle de division cellulaire demeure controversé. Par exemple, la protéine HBx stimule l'expression de FoxM1 via l'activation des voies de signalisation Ras/Raf/MAPK, Hedgehog, HIF-1 α et Yap (« Yes-associated protein ») (Lee et al. 2000 , Arzumanyan et al. 2012 , Zhang et al. 2012). L'expression de FoxM1 est stimulée par des voies de signalisation qui activent les cyclines et Cdks, et en retour, FoxM1 favorise la progression du cycle cellulaire (Raychaudhuri et al. 2011). De plus, FoxM1 est un facteur de transcription surexprimé dans le CHC (et dans d'autres tumeurs) et qui favorise fortement la métastase des tumeurs (Wierstra 2013). La production de ROS induite par HBx, favorise aussi la surexpression de FoxM1 qui déclenche à son tour, l'expression de gènes antioxydants tels que la superoxyde dismutase, la catalase et la peroxyrédoxine 3. Plus encore, il a été montré que la protéine HBx augmente l'expression de FoxM1 par la voie ERK/CREB et FoxM1 favorise l'invasion et la métastase via la surexpression de MMP-2/7/9, VEGF et active la voie RhoC (Xia et al. 2012). L'augmentation de FoxM1 stimule l'expression des protéases Skp2 et Cks1 qui dégradent p27 et induisent la progression G1/S. FoxM1 stimule également l'expression de gènes critiques à la progression G2/M comme Plk1 (« Polo-like kinase 1 »), Aurora B, Cycline B1, CDC25 B, CENP-A, C-myc et survivine (Xia et al. 2012).

Par ailleurs, bien que la protéine HBx modifie l'expression de gènes de la cellule hôte par transactivation (Colgrove et al. 1989 , Tang et al. 2005), des études ont montré que l'HBx agit également au niveau post-traductionnel. En effet, HBx se lie à Pin1, une prolyl *cis-trans* isomérase qui altère la fonction des protéines en changeant leur conformation (Pang et al. 2007). Le changement de conformation des protéines favorise ou bloque non seulement leur ubiquitination et dégradation via le protéasome mais modifie également leur capacité à subir des modifications post-traductionnelles indispensables à leur fonction (Theuerkorn et al. 2011). Pin1 stabilise HBx et plusieurs de ses cibles telles que la cycline D1, la β -caténine, NF- κ B, Nanog, Oct4 et ErbB2 (Liou et al. 2011) qui stimulent la survie et la prolifération.

e) HBx et progression tumorale

Les effets de la protéine HBx ont également été observés dans les étapes tardives de la tumorigenèse. Par exemple, les cellules exprimant l'HBx adhèrent moins à la fibronectine, ceci corrélé à une expression réduite d'intégrine $\alpha 5$, suggérant que la protéine HBx perturbe l'adhésion cellulaire en inhibant l'expression de l'intégrine (Lara-Pezzi et al. 2001). D'autres travaux ont montré que la protéine HBx favorise la migration cellulaire par une voie NF- κ B dépendante qui en induisant l'augmentation de l'ostéopontine (Zhang et al. 2012) favorise l'angiogenèse et la métastase par stimulation des voies PI3-K/AKT, EGFR, C-met et certaines métalloprotéases. Plus encore, l'activation de la voie Src par la protéine HBx, provoque la destruction des jonctions adhérentes (Lara-Pezzi et al. 2001), déclenche le réarrangement des molécules d'adhésion de surface comme le récepteur CD44 (Lara-Pezzi et al. 2001). La surexpression de MMP-1 induite par l'HBx, active MMP-2, ce qui conduit à la rupture de la capsule tumorale et à la métastase (Lara-Pezzi et al. 2002). De la même façon, l'HBx favorise la métastase en augmentant l'expression d'autres MMP telles que MMP-9 (Chung et al. 2004), MMP-3 (Yu et al. 2005), MMP-10 (Sze et al. 2013) et MMP-14 (Liu et al. 2010).

En conclusion, la protéine HBx participe au développement de la maladie chronique et au CHC par différents mécanismes. Cependant, pour être complet, il est à souligner que la plupart des données sur les mécanismes associant la protéine HBx au développement du CHC ont été obtenues en dehors de modèles d'infection par le VHB (culture d'hépatocytes primaires ou de souris avec un foie humanisé). Poursuivre par des approches plus globales, l'étude des mécanismes d'action de la protéine HBx et de ses mutants est donc important pour permettre d'identifier les cibles moléculaires de l'HBx et ainsi de développer des outils pour prévenir l'apparition de CHC chez les porteurs chroniques du VHB.

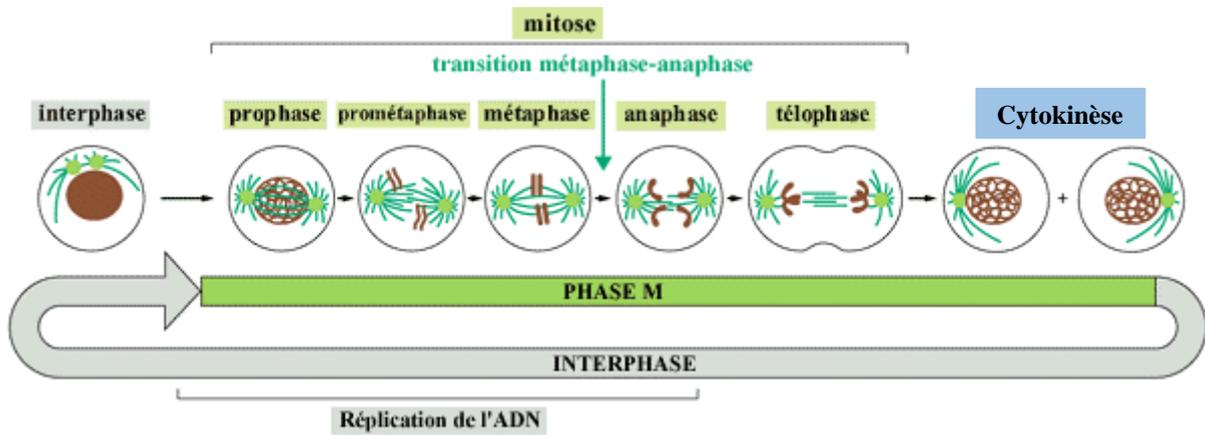
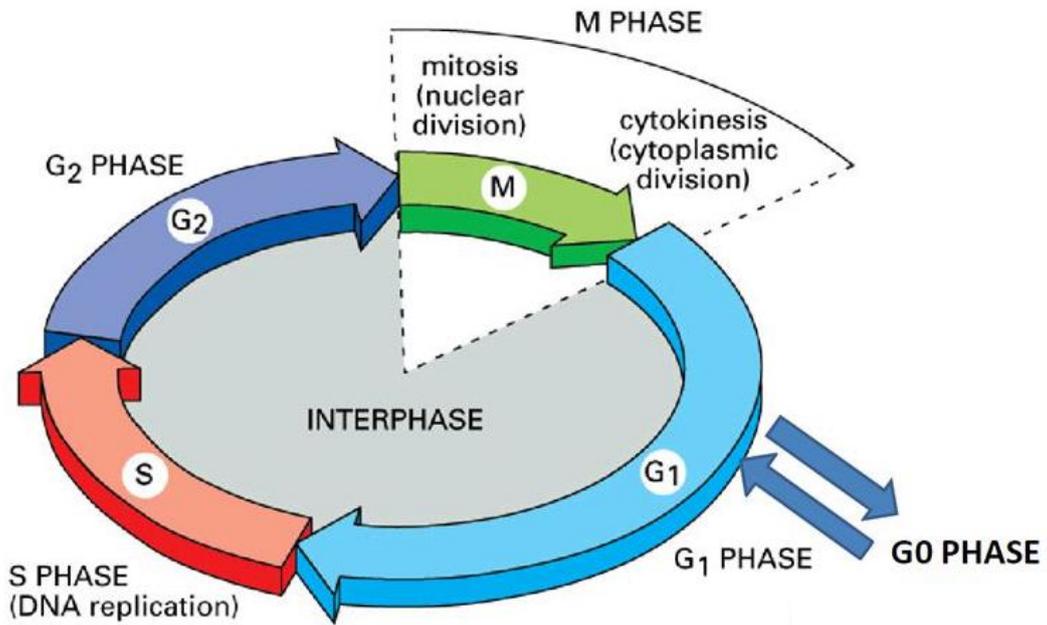


Figure 20 : Les phases du cycle cellulaire.

PARTIE 3 : Le cycle de division cellulaire et sa régulation

I- Le cycle cellulaire

La division cellulaire est un processus essentiel au développement embryonnaire mais également vital pendant toute la vie de l'organisme adulte. C'est le processus fondamental par lequel une cellule-mère donne deux cellules-filles identiques entre elles et à la cellule dont elles dérivent. Le « cycle cellulaire » est essentiellement constitué de deux temps, l'interphase, au cours de laquelle les chromosomes sont répliqués, et la mitose, au cours de laquelle les chromosomes se répartissent entre les deux cellules filles. En réalité, à côté de ce cycle de division chromosomique, existent des cycles cytoplasmique, centrosomique, nucléolaire et un cycle de l'appareil de Golgi. Tous ces événements parfaitement couplés sont interdépendants (Malumbres et al. 2001).

L'interphase est composée des phases G₀, G₁, S et G₂. Sous l'effet de signaux mitogènes, les cellules en phase G₀ (cellules quiescentes), entament un cycle de division. Au cours de la phase G₁, phase de « Gap » ou d'intervalle, les cellules passent par le point de restriction, une sorte de point de non-retour à partir duquel le cycle est irréversiblement engagé et l'entrée en division ne dépend plus de la présence des facteurs mitogènes. La phase G₁ est préparatrice à la phase S au cours de laquelle l'ADN est répliqué. La phase G₂ est suivie de la phase M, ou mitose, au cours de laquelle les chromosomes dédoublés sont répartis dans les deux cellules-filles, grâce au fuseau de division. La phase M est découpée en cinq périodes : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. La cytokinèse achève la division de la cellule (Fig. 20).

Les phases s'enchaînent de façon coordonnée, chaque phase ne pouvant commencer que lorsque la précédente s'est déroulée correctement. En effet de nombreux mécanismes de contrôle ou « Checkpoints » assurent une sorte de « Contrôle qualité » à chaque étape et bloquent le déroulement du cycle lorsqu'une anomalie (par exemple, dommage à l'ADN, ADN non complètement répliqué, chromosomes non attachés au fuseau mitotique) est détectée (Pommier et al. 2003 , Stewart et al. 2003). Sous l'effet de signaux anti-mitogènes ou suite à la disparition des agents mitogènes, les cellules cessent toute prolifération, quittent le cycle cellulaire et retournent en phase de quiescence.

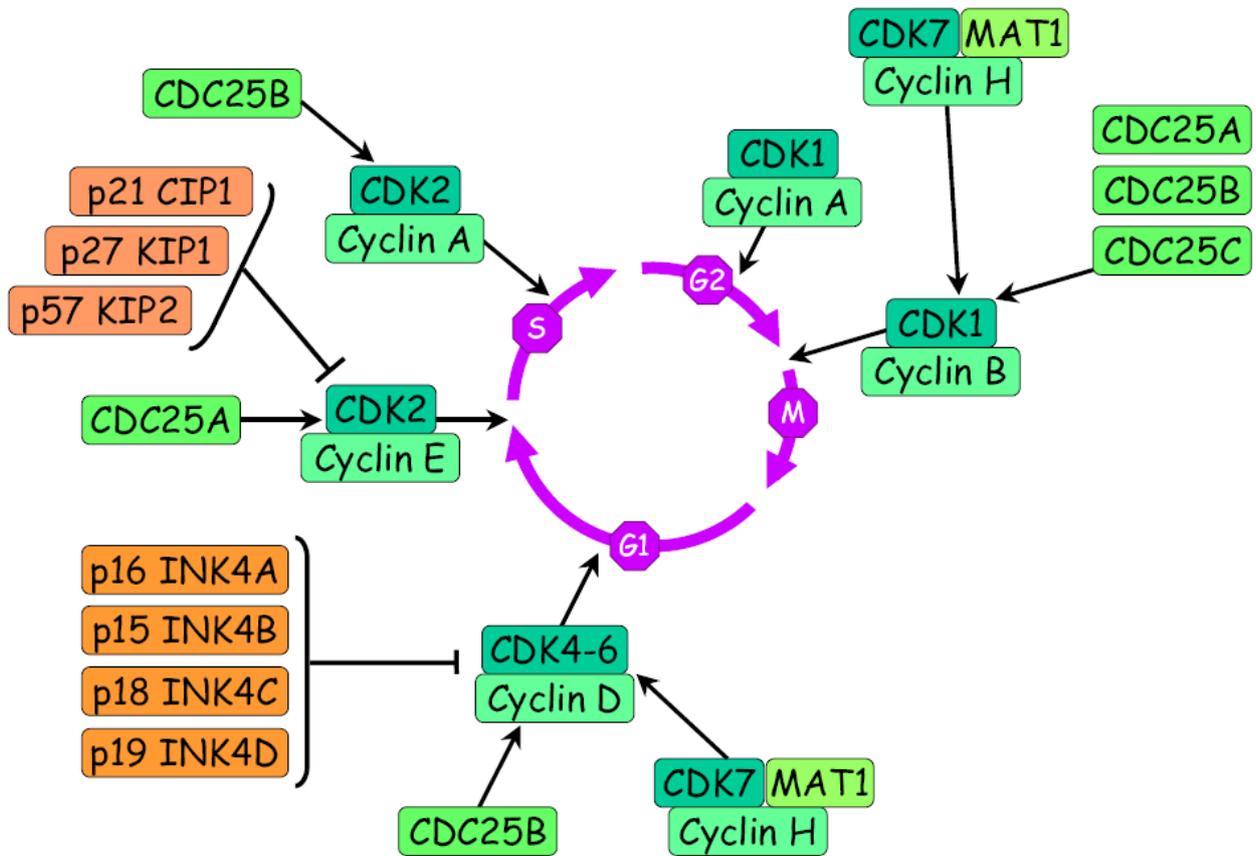


Figure 21 : La régulation du cycle de division cellulaire. Les CDKs contrôlent le cycle cellulaire. Ces CDKs sont régulés par phosphorylation/déphosphorylation et par des inhibiteurs protéiques.

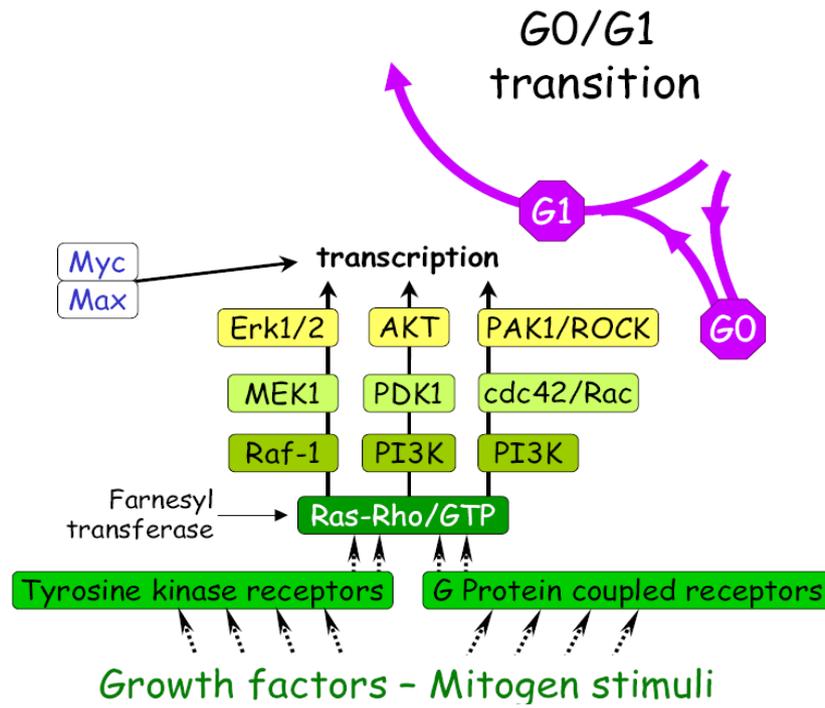
A) Les régulateurs clés de la progression du cycle cellulaire : Cyclines et CDKs

Les CDKs ou « Cyclin-Dependent Kinases » jouent en effet un rôle essentiel dans le déclenchement, le contrôle et la succession harmonieuse des différentes phases du cycle. Les CDKs sont actives uniquement sous forme d'un complexe entre une sous-unité catalytique (CDK) et une sous-unité régulatrice (cycline).

Brièvement, Cdk4 et Cdk6, associées à des cyclines de type D, régulent le déroulement de la phase G1. Puis Cdk2/cycline E prend le relais pour assurer la transition G1/S, suivie par Cdk2/cycline A qui assure le contrôle de la phase S. Cdk1/cycline A intervient en G2, Cdk1/cycline B régule la transition G2/M et l'entrée en mitose (Fig. 21) (Lim et al. 2013). A l'heure actuelle, on dénombre plus de 20 CDKs et 11 Cyclines dont certaines sont impliquées dans des processus tels que les régulations épigénétiques, le métabolisme, le renouvellement de cellules souches, le contrôle des fonctions neuronales ou la spermatogenèse (Lim et al. 2013).

L'association des cyclines avec les CDK est transitoire et leur activité est régulée par différents processus. En effet, les cyclines ont une durée de vie généralement courte qui passe par une succession rapide de synthèse, d'interaction avec une CDK, puis de dégradations ubiquitine-dépendantes. Par ailleurs, l'activation ou l'inactivation des CDKs sont régulées par de nombreuses modifications post-traductionnelles que sont essentiellement des phosphorylations/déphosphorylations (Nilsson et al. 2000). Cdk1 par exemple, est phosphorylée sur deux résidus adjacents, Thréonine-14 et Tyrosine-15, situés au bord de la poche de fixation de l'ATP. Cette phosphorylation inhibitrice est levée par une famille de phosphatases très particulières, les phosphatases Cdc25 A, B, C. En revanche la phosphorylation de la Thréonine-161 pour Cdk1, est essentielle à son activation. Cette phosphorylation est catalysée par Cdk7 associée à la cycline H et un cofacteur, Mat1. Enfin, des associations transitoires avec des inhibiteurs protéiques, les CKIs « Cdk Inhibitors », permettent une régulation fine de leurs activités (Fig. 21). Les CKIs sont regroupées en deux classes, basées sur leur structure et la spécificité de la CDK reconnue. La famille INK4 regroupe les protéines p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} et p19^{INK4d} qui ciblent préférentiellement les CDK4 et 6 et les empêchent de s'associer avec les Cyclines D. A l'inverse, les membres de la famille CIP/KIP ou WAF, p21^{Cip1}, p27^{KIP1} et p57^{KIP2} interagissent avec les complexes Cdk4/Cycline D et Cdk2/Cycline E, A et B préformés. De façon surprenante, p21^{CIP1} et p27^{KIP1} se fixent sur Cdk4 sans en inhiber l'activité kinase, ils sont en fait nécessaires pour l'assemblage du complexe Cdk4/cycline D et sa translocation dans le noyau. Par contre ces deux protéines sont

A



B

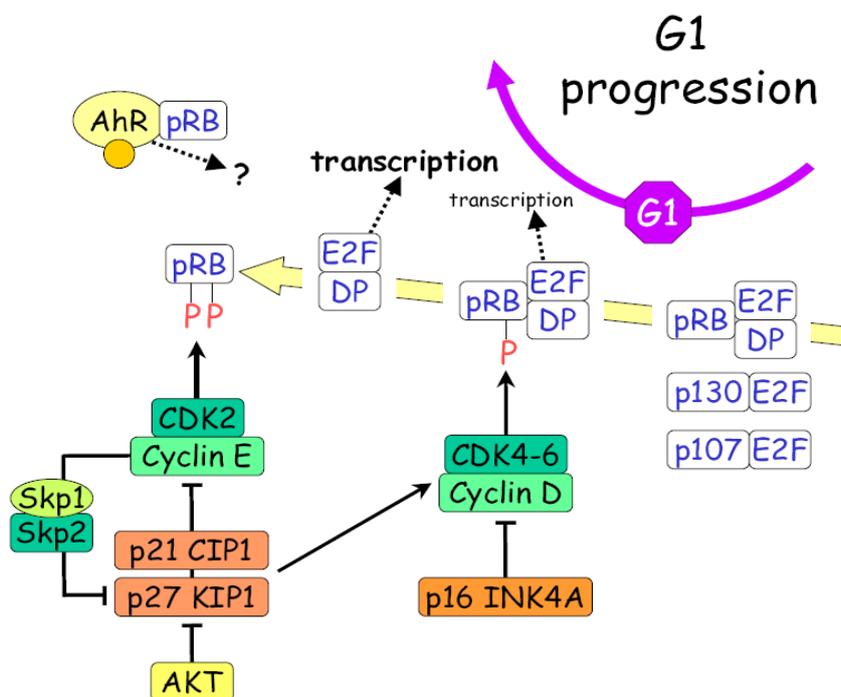


Figure 22 : La régulation du cycle de division cellulaire. (A) Transition G0/G1, (B) Progression en phase G1.

d'excellents inhibiteurs de Cdk2/cycline E. L'apparition de p21^{CIP1} et p27^{KIP1} permet donc la formation des complexes Cdk4/cyclines D, tout en retardant l'activation des complexes Cdk2/cycline E. Enfin, Cdk2/cycline E, en phosphorylant p27^{KIP1}, conduit à son ubiquitination par Skp1/Skp2, et à sa destruction par le protéasome (Bloom et al. 2003). Cette élimination de p27^{KIP1} contribue à l'entrée en phase S.

Contrairement à ce qui est connu depuis de très longues années, des études génétiques chez des modèles murins ont révélé que les Cdk2, Cdk4 et Cdk6 ne seraient pas indispensables pour le cycle cellulaire des mammifères, mais joueraient plus un rôle dans la prolifération spécifique de cellules hautement spécialisées (Tsutsui et al. 1999, Ortega et al. 2003, Malumbres et al. 2004). En revanche, Cdk1 semblerait indispensable pour la division cellulaire de l'embryon. Par ailleurs, la présence de Cdk1 serait suffisante pour compenser l'absence de toutes les autres CDKs et assurer la transition entre toutes les étapes de l'interphase, dans tous les types cellulaires, au moins jusqu'à la moitié de la gestation (Santamaria et al. 2007).

B) L'interphase

L'interphase est caractérisée par la décondensation et la dispersion des chromosomes dans tout le noyau. C'est la période pendant laquelle la croissance cellulaire et la réplication de l'ADN s'effectuent de manière coordonnée en vue de la division cellulaire. La cellule grossit progressivement pendant toute l'interphase, la plupart doublant de taille entre leur naissance et leur division en deux cellules filles.

1- La phase G0

Sous l'effet de signaux mitogènes, les cellules quiescentes ou inactives entament un cycle de division. De nombreux facteurs mitogènes ont été identifiés et agissent en général via des récepteurs transmembranaires de type tyrosine kinases ou encore couplés à des protéines G. Il s'ensuit alors une activation d'une cascade de protéines kinases, de type MAPKKK/MAPKK/MAPK, telle Raf/MEK1/Erk1/2 ou bien PI3K/PDK1/AKT (Fig. 22A). Par exemple, l'activation de la voie de signalisation ERK par phosphorylation entraîne l'expression de gènes nommés « Immediate Early Genes », notamment ceux de la famille AP-1, et permet par la suite la stimulation de la transcription de gènes essentiels pour l'entrée en division (en particulier cyclines D, CDKs). Une autre voie importante également impliquée dans l'entrée en division est celle de l'oncogène Myc, qui en dimère avec la protéine Max,

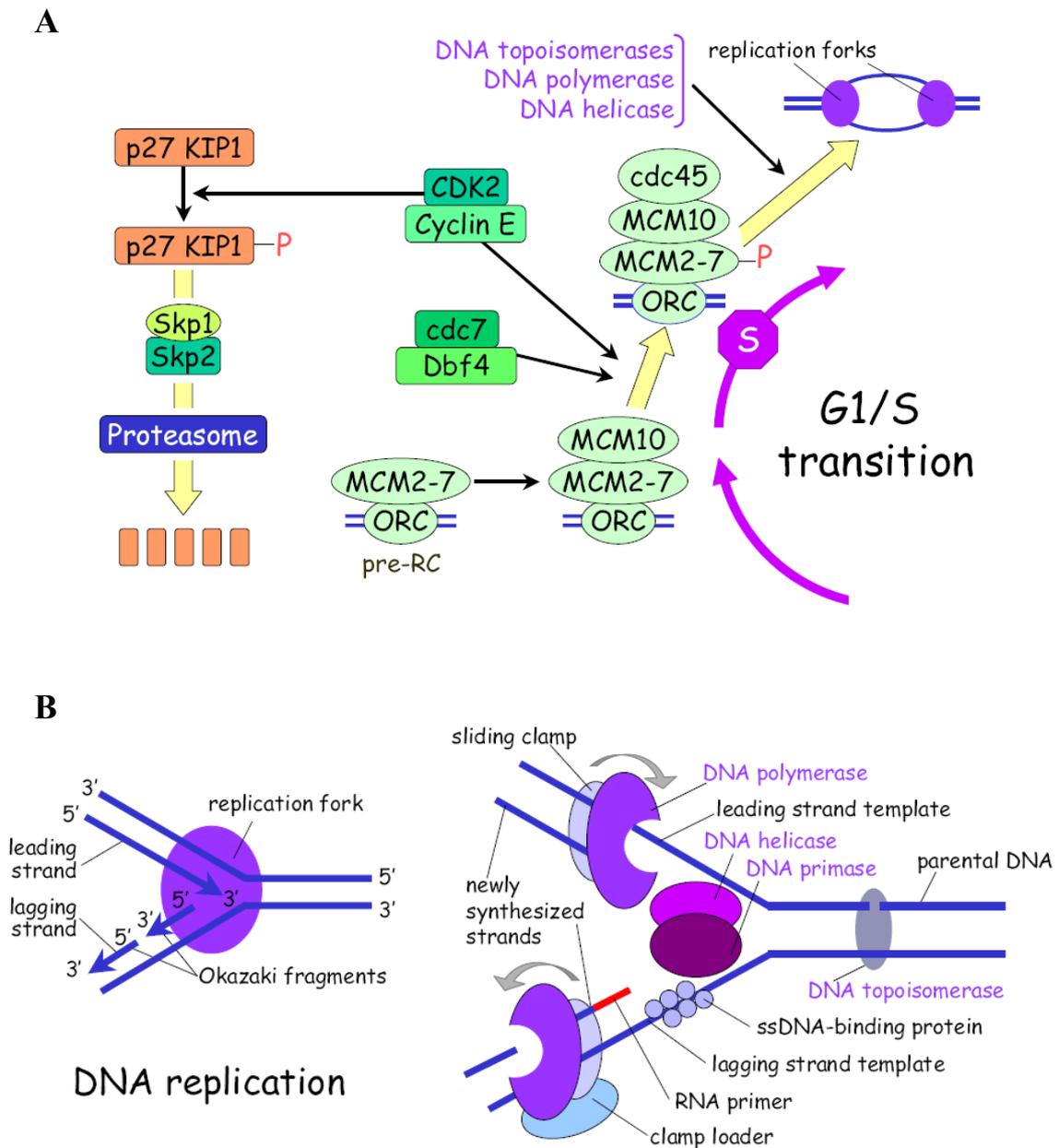


Figure 23 : La régulation du cycle de division cellulaire. (A) Transition G1/S, (B) Phase S et mécanisme de réplication de l'ADN.

active la transcription des gènes de cyclines D et E, de phosphatase Cdc25A, de Cdk4 et de facteur de transcription de la famille E2F (Wanzel et al. 2003).

2- La phase G1

Au cours de cette phase, s'effectuent la synthèse des protéines et la multiplication des organites cellulaires. Le début du cycle cellulaire est caractérisé par la transcription d'un certain nombre de gènes, tels que ceux des cyclines D et E, p21^{CIP1}, p27^{KIP1} et des gènes sous le contrôle des facteurs de transcription de la famille E2F. Les cellules sont maintenues en G1 grâce aux protéines de la famille du rétinoblastome : pRb, p107 et p130 (« Pocket proteins »). Ces suppresseurs de tumeurs bloquent le cycle cellulaire en s'associant avec E2F. Au cours de la phase G1, les CDKs et les complexes Cdk2/Cycline E en phosphorylant pRb, induisent la dissociation du complexe pRb/E2F, et donc la libération de facteurs E2F actifs (Harbour et al. 1999) (Fig. 22B). Une activation transcriptionnelle est ensuite initiée par Cdk4 et 6 associées aux cyclines D. La famille E2F régule l'expression de gènes impliqués dans la transition G1/S, mais aussi de gènes codant pour des protéines contrôlant la réplication (MCM, Cdc6), des enzymes nécessaires à la synthèse d'ADN. E2F1, E2F2 et E2F3 sont des activateurs transcriptionnels puissants contrôlés par pRb. Les phosphorylations inactivatrices de pRb impliquées dans la levée du « point de restriction R » en fin de phase G1, permettent une progression en phase G1 indépendante de tous stimuli mitogènes exogènes.

On comprend pourquoi les inhibiteurs naturels de CDKs, des familles INK4 et CIP1/KIP, en maintenant pRb sous forme hypo-phosphorylée, donc liée à E2F, constituent des inhibiteurs puissants du cycle cellulaire. L'inactivation de ces inhibiteurs permet la progression de la cellule en phase G1 et vers la transition G1/S.

3- La transition G1/S et la phase S

La préparation à la transition G1/S commence tout d'abord par l'assemblage d'un complexe pré-répliatif (pre-RC) au niveau de plus d'une centaine de sites le long du génome (Fig. 23) : on parle de « Licensing ». Ce complexe composé de six sous-unités ORC ou « Origin Recognition Complex », lie l'ATP (Diffley 1996), puis se fixe sur l'ADN au niveau des origines de réplication. L'ORC recrute ensuite deux facteurs essentiels, Cdc6, une ATPase, et Cdt1, un facteur de transcription (Duncker et al. 2009). Ces deux facteurs essentiels interviennent ultérieurement pour permettre l'accrochage des six protéines (MCM2-7) du complexe MCM

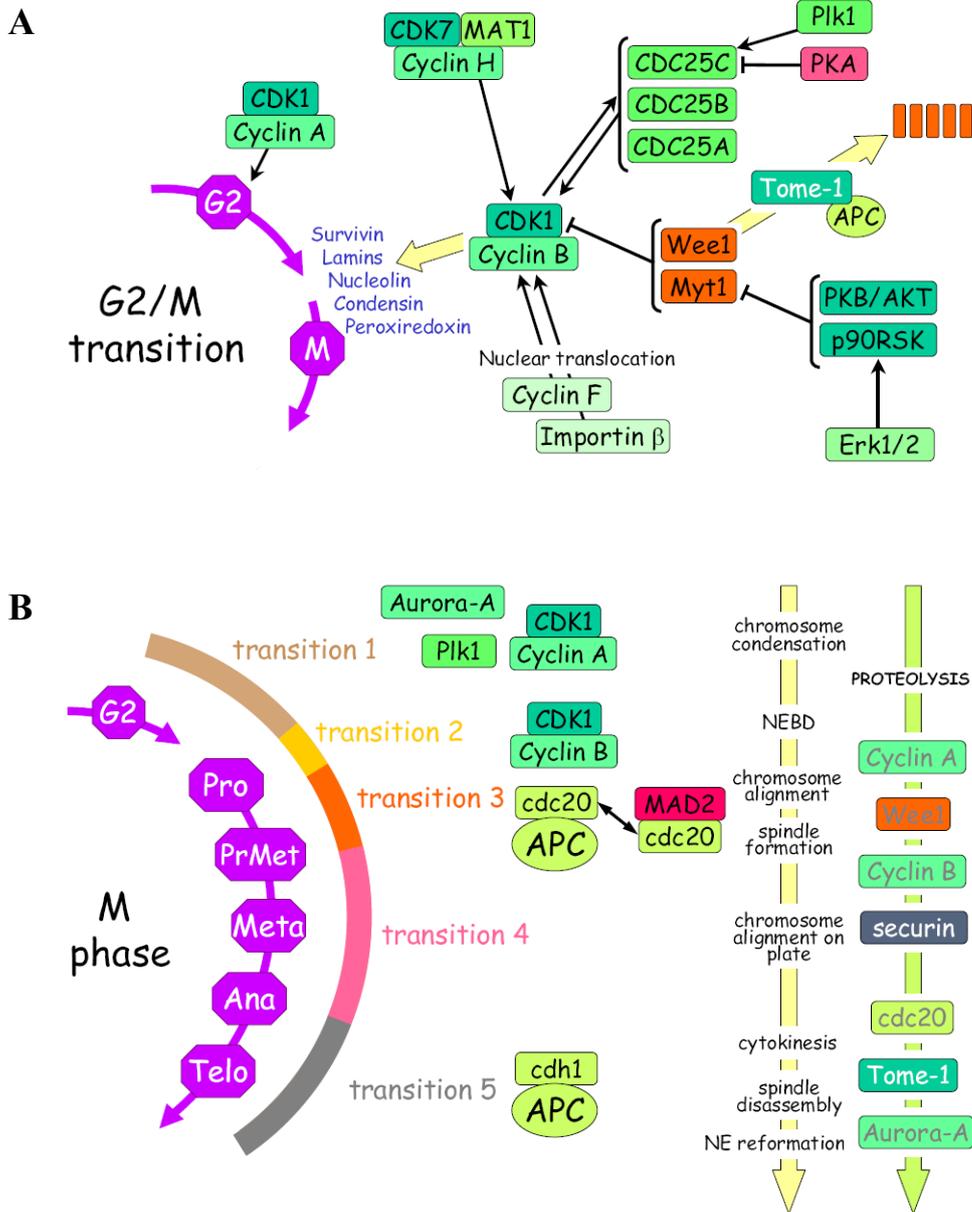


Figure 24 : Le cycle de division cellulaire. (A) Régulation de la transition G2/M, (B) Régulation des différentes étapes de la Mitose.

(« minichromosome maintenance »). Afin d'initier la synthèse d'ADN, plusieurs protéines et complexe protéiques s'associent aux complexes pré-réplicatifs (Fig. 23). La protéine MCM10/Dna43 se fixe en premier au complexe pré-réplicatif. La kinase Cdc7 commence par activer le complexe pré-réplicatif en fin de phase G1 (Fig. 23). La kinase Cdk2/cycline E intervient ensuite et le complexe peut alors fixer Cdc45, un facteur indispensable pour l'accrochage de l'ADN polymérase α . Une ADN hélicase est alors activée au niveau des fourches de réplication, et les ADN polymérases peuvent commencer à agir. La topologie de l'ADN est maintenue par l'activité de plusieurs topoisomérases (Bell et al. 2002). Le recrutement de Cdk2 aux origines de réplifications se fait grâce aux ORC et à Cdc6. Cdk2/cycline E phosphoryle p27^{KIP1} stimulant son ubiquitination par Skp1/Skp2, et sa destruction par le protéasome, contribuant ainsi à la transition G1/S (Bloom et al. 2003).

Différents travaux ont montré que l'expression de la cycline A est un facteur crucial pour l'entrée en phase S. En effet, sa surexpression en phase G1 accélère la progression dans cette phase et l'entrée en phase S (Resnitzky et al. 1995). A l'inverse, la micro-injection d'anticorps ou d'anti-sens anti-cycline A, empêche la réplication de l'ADN (Pagano et al. 1992).

La phase S est associée à une réplication semi-conservative de l'ADN, chaque brin d'ADN servant de matrice pour la formation d'un nouveau brin complémentaire et à la duplication des centrosomes. Afin de prévenir des processus de ré-réplication, l'activité de « Licensing » doit être inhibée une fois que la phase S a commencé. La régulation de l'activité de Cdc6 et Cdt1 est la principale voie qui empêche ces phénomènes de ré-réplication. Brièvement, la phosphorylation de Cdc6 par Cdk2 l'inactive en provoquant sa dégradation ou son export hors du noyau; quant à Cdt1, elle est inactivée par une interaction avec la géminine, protéine nucléaire dont l'expression et l'activité sont restreintes aux phases S, G2 et M (Blow et al. 2005, DePamphilis 2005).

4- La phase G2 et la transition G2/M

La phase G2 est le début de la condensation des chromosomes et est souvent présentée comme une phase de préparation à la mitose. La condensine, principale responsable du phénomène de condensation chromosomique, assure le super-enroulement, ATP-dépendant, de la molécule d'ADN dans des conditions topologiques définies. Le fonctionnement de la condensine et sa sumoylation sont dépendants de l'activité du complexe Cdk1/cycline B (Fig. 24).

L'interaction topoisomérase II/Cdk1 semble également être impliquée dans la condensation des

chromosomes sans nécessiter pour autant l'activité catalytique de Cdk1. Enfin la phosphorylation de l'histone H3 (CENP-A, variant au niveau des centromères) par la kinase Aurora-B est également directement impliquée dans la condensation chromosomique.

Au cours de la phase G2, se forme également le complexe MPF ou « Maturation/Mitosis Promoting Factor », composé de Cycline B et de Cdk1 (Kishimoto 2015). L'activation de Cdk1/cycline B permettant à la cellule d'entrer en phase M est régulée par différents facteurs : i) l'inactivation des kinases inhibitrices Wee1 et Myt1 par les kinases PKB/AKT et p90^{RSK} ou leur dégradation induite par l'association des protéines Tome-1 (Trigger of mitotic entry) et Skp1 en fin G2; ii) la déphosphorylation des résidus inhibiteurs, Thréonine-14 et Tyrosine-15 par les phosphatases Cdc25. L'activation de Cdk1/cycline B est amorcée par Cdc25B. Cdc25C est ensuite activée par phosphorylation d'une part, par Cdk1/cycline B, générant un système d'auto-amplification, et d'autre part, par Plk1; Cdc25A est alors stabilisée par phosphorylation par Cdk1/cycline B; iii) la phosphorylation de la cycline B par diverses kinases, est indispensable à l'interaction entre Cdc25 et Cdk1, donc à l'activation de la kinase; iiiii) la migration nucléaire du complexe Cdk1/cycline B, où il trouve la plupart de ses substrats (lamines, nucléoline, condensine...).

C) La phase M ou Mitose

Le terme mitose fut introduit dans les années 1880, par les études de Walther Flemming qui compara les chromosomes à des fils (mitose ou « misos » en grec signifie « fil »). La phase M comporte des phases décrites essentiellement sur la base de la morphologie des chromosomes et de l'enveloppe nucléaire : i) La prophase correspond à la fin de condensation des chromosomes et à la rupture de l'enveloppe nucléaire (NEBD ou « Nuclear envelope breakdown »). Les centrosomes, dupliqués lors de la phase S, se séparent et organisent le fuseau mitotique; ii) La prométaphase est la période de formation du fuseau et du début d'alignement des chromosomes. Les microtubules des deux pôles du fuseau établissent des connections avec chaque chromosome. Ces microtubules connectés aux chromosomes sont dits « kinétochoriens », par opposition aux microtubules « astraux » organisés radialement autour des centrosomes. Les chromosomes subissent alors un mouvement de congression vers l'équateur du fuseau; iii) La métaphase est la phase d'alignement des chromosomes dans le fuseau en une plaque métaphasique à équidistance des pôles; iiiii) L'anaphase est l'une des étapes fondamentales de la mitose puisqu'elle permet la disjonction des chromosomes formés de deux chromatides en

chromosomes à une chromatide identique à celle de la cellule mère. La séparation des chromatides-sœurs est sous la dépendance d'une cascade moléculaire dont une étape majeure est l'activation de l'APC/c ou « Anaphase Promoting Complex/cyclosome » (Peters 2006). Lorsque la cellule entre en mitose, le complexe Cdk1/Cycline B phosphoryle l'APC/c, ce qui augmente son affinité pour la protéine Cdc20. Il se forme alors de nombreux complexes APC/Cdc20, dont un des rôles est la destruction de la protéine sécurine, protéine inhibitrice de la séparase. Devenue active, la séparase clive une sous-unité du complexe cohésine, induisant une séparation des chromatides sœurs. L'ensemble de ces processus permet aux chromosomes de migrer vers les pôles du fuseau lors de l'anaphase A, puis la distance entre les deux pôles augmente en anaphase B; iiiii) Le passage à la télophase est déclenché par l'inactivation du complexe Cdk1/Cycline B via une protéolyse ubiquitine-dépendante de la Cycline B médiée par le complexe APC-Cdh1 (homologue Cdc20). Après la migration des chromosomes aux pôles du fuseau, l'ADN se décondense et l'enveloppe nucléaire se reforme.

Au cours de la mitose, l'attachement correct des chromosomes au fuseau mitotique est indispensable au déclenchement de l'anaphase et représente un point de contrôle important. Brièvement, les chromosomes non attachés au fuseau déclenchent la formation d'un complexe nommé MCC « Mitotic Checkpoint Complex », composé notamment des protéines BubR1, Bub3, Mad2... Le rôle de ce complexe est de séquestrer la protéine Cdc20. Une fois que tous les kinétochores sont attachés, le complexe MCC se dissocie et permet le relargage de Cdc20. Cette dernière active alors l'APC/c induisant ainsi la destruction de la sécurine et donc la séparation des chromatides, mais aussi l'ubiquitination et la dégradation de la cycline B1 pour permettre la sortie de mitose (Fig. 25) (Musacchio et al. 2002). Ces événements tardifs ont lieu alors que la cytokinèse a déjà débuté.

D) La cytokinèse

La cytokinèse est l'étape finale de la division qui conduit à l'individualisation des deux cellules-filles (Guertin et al. 2002). La cytokinèse, de toute évidence, est parfaitement synchronisée avec le cycle nucléaire. Elle n'est possible que lorsque les deux lots de chromosomes sont répartis de façon symétrique entre les deux futures cellules-filles. Trois familles de kinases participent à cette régulation, Cdk1, la kinase Plk1 et la kinase citron. L'inactivation de Cdk1 est indispensable au déclenchement de la cytokinèse, car Cdk1 inhibe la myosine en phosphorylant sa chaîne légère MRLC ou « Myosin Regulatory Light Chain » et aussi d'autres substrats. Plk1

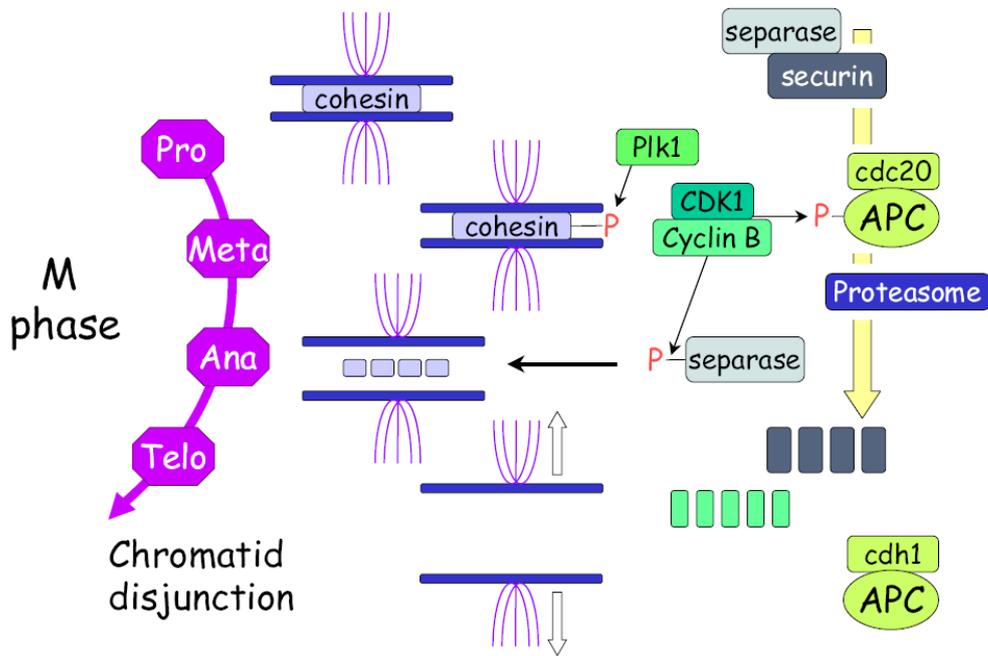


Figure 25 : La régulation de la séparation des chromatides sœurs lors de l’anaphase.

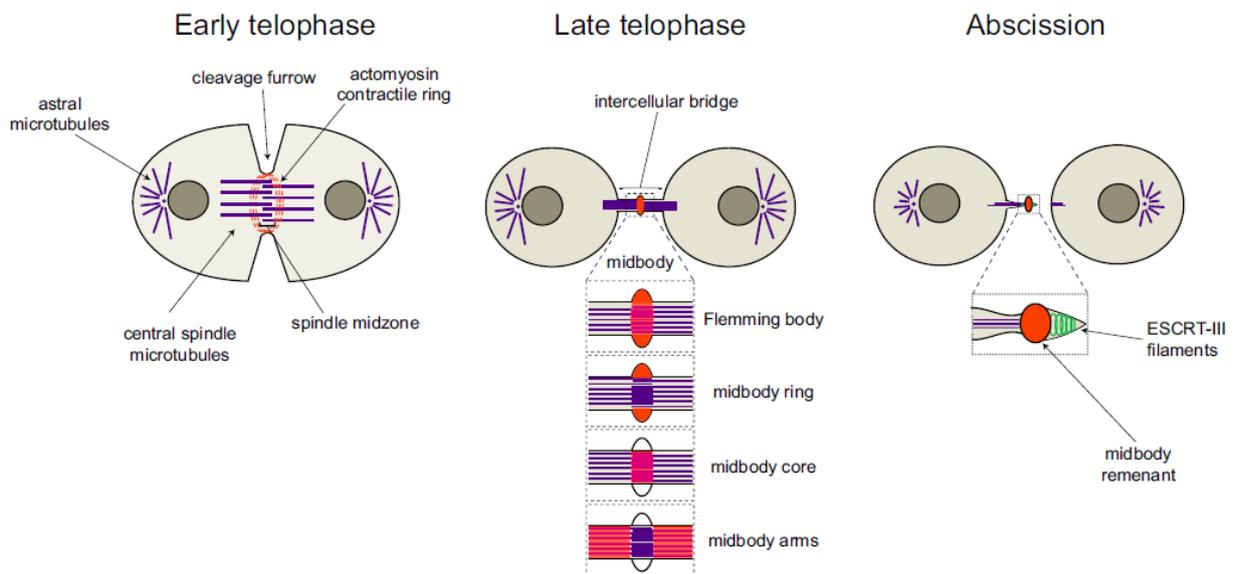


Figure 26 : La Cytokinèse et la régulation de la formation du midbody.

pourrait contribuer au déclenchement de la cytokinèse en participant à la destruction de la cycline B et donc à l'inactivation de Cdk1. En effet, la diminution de l'activité de Cdk1 lors de la transition métaphase-anaphase concourt à l'activation de tout un panel de protéines (par déphosphorylation) qui agissent pour permettre une réorganisation du cytosquelette, nécessaire à la mise en place de la cytokinèse (D'Avino et al. 2005).

La cytokinèse est caractérisée par la mise en place d'un anneau contractile contenant de l'actine, de la myosine associée à une multitude de protéines (Fig. 26). L'anneau se contracte au niveau équatorial du fuseau mitotique en une zone dense appelée « Mid-body », zone centrale où se chevauchent les microtubules émanant des deux pôles du fuseau. L'organisation de la zone centrale du fuseau mitotique est assurée par les protéines PRC1 (Jiang et al. 1998), le complexe CentralSpindlin composé de la kinésine motrice mmp et une GAP activatrice de Rho-GTPase, MgcRacGAP (Mishima et al. 2002, Pavicic-Kaltenbrunner et al. 2007). Le complexe protéique CPC « Chromosomal Passenger Complex », participe également à la régulation du complexe CentralSpindlin. Il comprend la kinase Aurora B, INCENP ou « Inner Centromere Protein », une sous-unité régulatrice d'Aurora B, ainsi que la survivine et la borealine (Ruchaud et al. 2007). Aurora B est particulièrement impliquée dans cette régulation, probablement en phosphorylant Mklp1 (Guse et al. 2005). Dans la zone centrale du fuseau, l'interaction entre ECT2 et CYK4 est régulée par la kinase Plk1 (Burkard et al. 2007, Petronczki et al. 2007). L'activation d'ECT2 déclenche l'accumulation de RhoA (RhoA-GTP) au cortex au niveau de la zone centrale du fuseau. En retour, RhoA-GTP recrute les formines, qui commencent à nucléer des filaments d'actine, et la Rho kinase ROCK, qui permet l'activation de la Myosine II en phosphorylant sa chaîne légère rMLC et en inhibant la phosphatase de la myosine, la protéine MYPT (Dean et al. 2005, Matsumura 2005, Hickson et al. 2006). Ce recrutement d'actine et de Myosine II initie l'assemblage de l'anneau contractile dont la formation et l'emplacement sont régulés par la protéine Anilline. Il a notamment été montré que l'Anilline interagit en fait directement avec RhoA (Piekny et al. 2008) mais aussi avec sa GAP MgcRacGAP (D'Avino et al. 2008, Gregory et al. 2008). Comme l'Anilline interagit aussi avec de multiples composants de l'anneau contractile, il a été proposé qu'elle constitue une plateforme pour coordonner l'activation de RhoA à l'assemblage des composants en anneau contractile et les retiendrait à l'équateur pendant la progression de la cytokinèse (D'Avino 2009). Une fois que l'anneau contractile est formé, sa contraction conduit à la compaction de la zone centrale du fuseau, qui devient alors le corps central ou « midbody », un faisceau très compact de microtubules entouré d'une matrice dense en protéines. Ce « midbody » se localise

au niveau du pont cellulaire reliant les deux cellules filles. Des forces de traction conduisent alors à un allongement drastique de ce pont et sa rupture finit par permettre la séparation physique des cellules filles (Chen et al. 2012).

II- Autres intervenants du cycle

A) Le cycle des centrosomes

Le cycle de réplication des chromosomes est étroitement lié à la duplication du centrosome (Nigg et al. 2011). Le centrosome est un organite organisateur des microtubules qui assure la formation du fuseau mitotique mais qui joue également un rôle dans la transition G1/S. Il est constitué d'une matrice protéique associée à une paire de centrioles (structure cylindrique constituée de 9 triplets de microtubules). Sa réplication passe par plusieurs phases hautement régulées (Tsou et al. 2006) que sont la duplication, l'élongation, la maturation, la séparation et la ségrégation (Fig. 27).

A la fin de la phase G1, l'activité de la séparase induit le désassemblage des 2 centrioles. Au cours de la phase S, la duplication des centrosomes est initiée par un processus semi-conservatif, dans la mesure où chaque nouveau centriole est formé à partir d'une structure accolée au centriole préexistant (Kochanski et al. 1990). On obtient ainsi deux centrosomes: l'un contient le centriole le plus ancien portant des appendices distaux, l'autre est encore immature. La maturation de ce pro-centriole implique le recrutement de la γ -tubuline au sein d'une structure appelée matériel péri-centriolaire ou PCM, afin d'augmenter l'activité de nucléation des microtubules. La kinase Plk1 est nécessaire au recrutement de la γ -tubuline au PCM (Lane et al. 1996). Parmi les régulateurs essentiels de la duplication des centrosomes, on trouve les complexes Cdk2/ cyclines E et A (Hinchcliffe et al. 1999 , Meraldi et al. 1999).

L'élongation des centrioles filles et la maturation du deuxième centrosome continuent pendant la phase G2. A la transition G2/M, le pont protéique reliant les 2 centrosomes est rompu, via l'action de la protéine kinase NEK2 (famille NIMA). Le complexe Cdk1/Cycline B phosphoryle et inactive la phosphatase PP1, un antagoniste de la kinase NEK2. Cette dernière devenue active phosphoryle différentes protéines du pont protéique comme la protéine NAP1, les rendant ainsi plus prédisposées à l'ubiquitination et donc à la protéolyse (Fry et al. 2001). La migration des centrosomes au pôle de la cellule est alors possible et dépend de la force générée par des protéines à fonction motrice telles que la kinésine Eg5 (Blangy et al. 1995) et

XKLP2 (Boleti et al. 1996). L'activité de Eg5 est régulée par les kinases Cdk1/Cycline B et Aurora A (Marumoto et al. 2005). Les centrosomes s'éloignent ensuite pour donner deux faisceaux de microtubules irradiant en étoile autour de chaque centrosome, appelés alors asters. Ces deux asters formeront les pôles du fuseau mitotique. Comme pour les chromosomes, les centrosomes sont repartis dans chaque cellule fille à l'issue de la mitose.

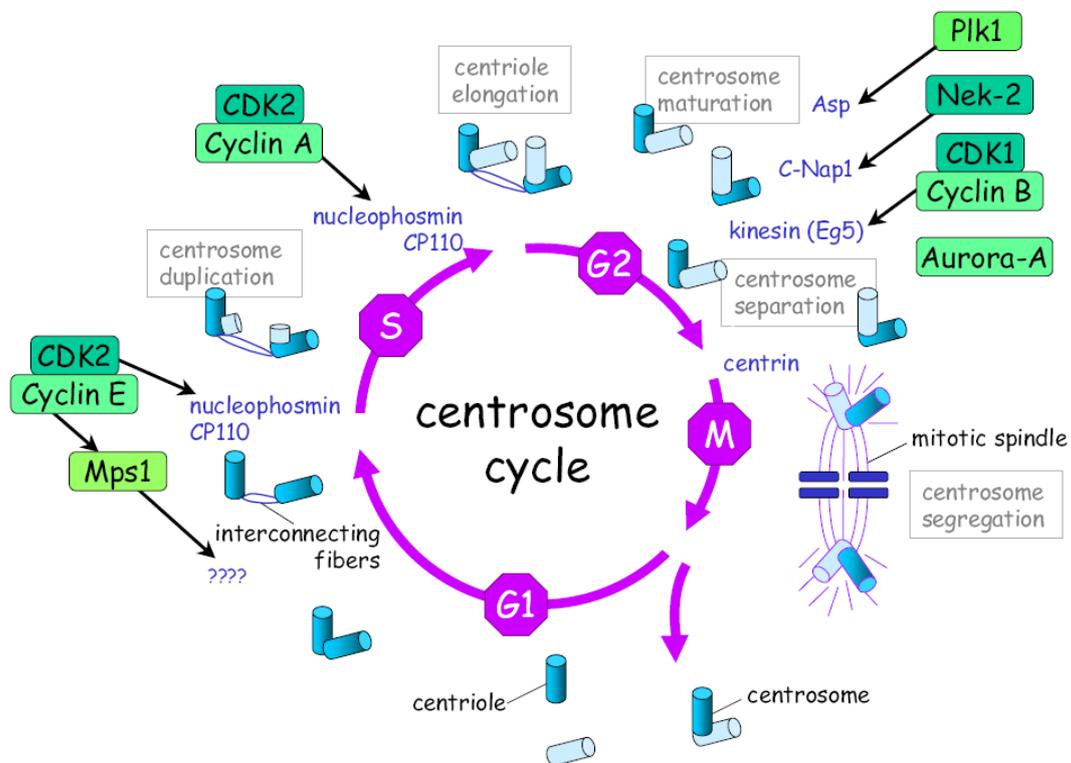


Figure 27 : Le cycle des centrosomes et sa régulation .

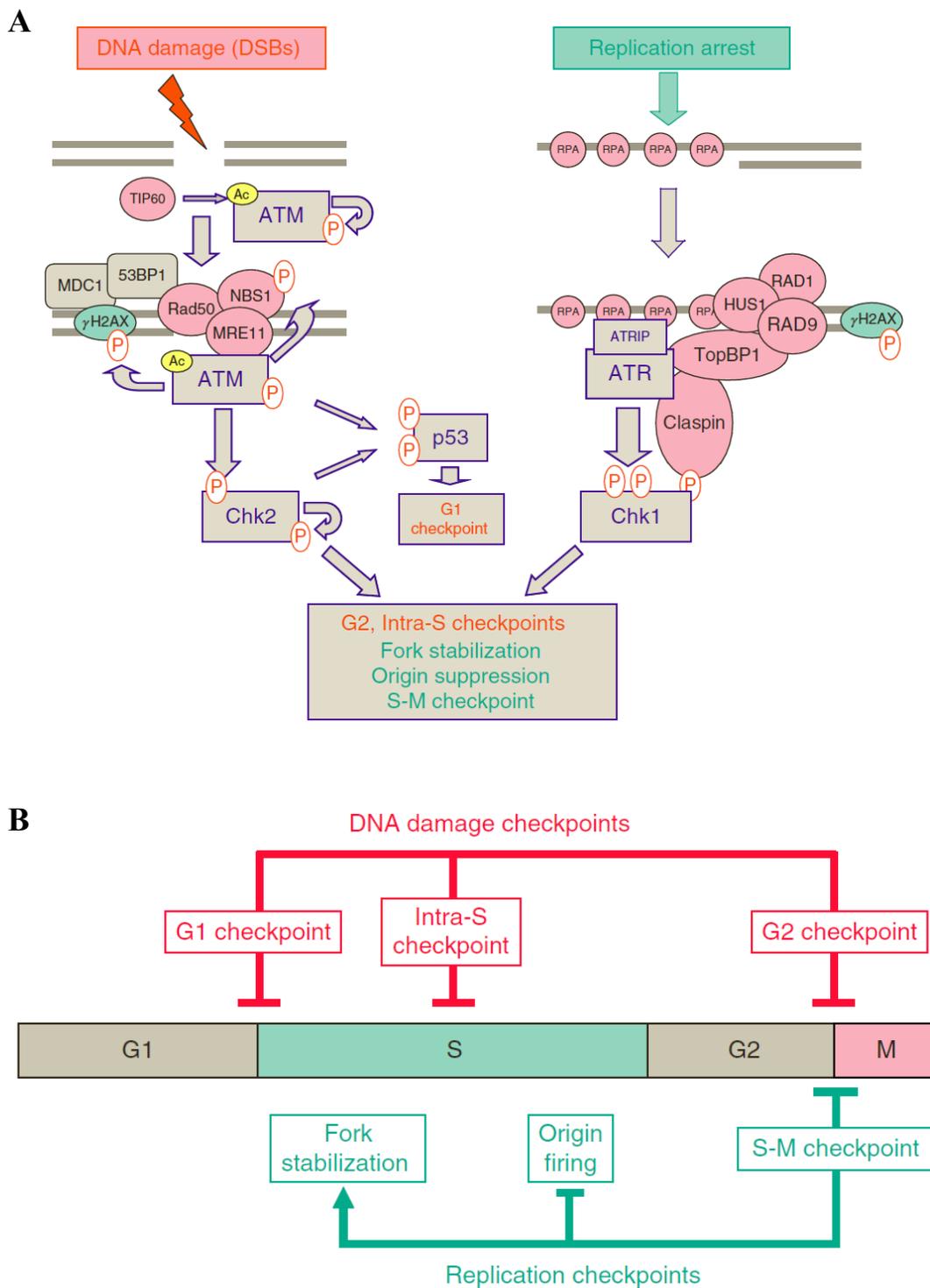


Figure 28 : La régulation des points de contrôle du cycle cellulaire. (A) Activation des voies de signalisations ATM-Chk2 et ATR-Chk1 respectivement aux cassures double ou simple brin de l'ADN. (B) Les points de contrôle associés aux différentes phases du cycle cellulaire et impacts sur la replication et la stabilisation de l'ADN.

B) Contrôle de l'intégrité génomique

Lorsque l'ADN est endommagé, des mécanismes complexes sont activés. Ils conduisent à un arrêt du cycle cellulaire et permettent à la cellule soit de réparer cet ADN endommagé, soit, si les dommages sont trop importants, d'enclencher un programme de mort cellulaire (Friedberg 2003). Plusieurs niveaux d'arrêts sont possibles. On parle ainsi des « G1/S checkpoint » lorsque l'entrée en phase S est bloquée jusqu'à réparation de l'ADN endommagé (blocage de Cdk2) et de « G2 DNA damage checkpoint », lorsque l'arrêt a lieu avant l'entrée en phase M (blocage de Cdk1). Ces mécanismes régulateurs impliquent deux kinases appartenant à la famille des « Phosphatidylinositol 3-kinase-like kinases » (PIKKs) : ATM (« Ataxia Telangiectasia Mutated ») et ATR (« ATM- and Rad3-related ») (Smith et al. 2010). La kinase ATM est activée en réponse aux radiations ionisantes et aux coupures double-brin, alors que les UV et les erreurs de réplifications activent plutôt la kinase ATR. Schématiquement, les kinases ATM et ATR ont au moins deux types d'effets (Fig. 28). Tout d'abord elles phosphorylent et activent les kinases Chk2 et Chk1 qui en retour phosphorylent et inactivent les phosphatases Cdc25A et Cdc25C. En conséquence, Cdk2 et Cdk1 restent inactives et le cycle cellulaire est arrêté, respectivement, en G1/S et en G2/M. Par ailleurs, ATM et ATR agissent également par une voie p53-dépendante. Le suppresseur de tumeur p53 est un facteur de transcription activé sous l'effet de multiples facteurs (dommages à l'ADN, hypoxie, choc thermique...). Il est responsable de l'induction d'un grand nombre de gènes conduisant à des réponses multiples et en particulier à un arrêt du cycle cellulaire ou au déclenchement de l'apoptose. Dans les conditions normales, p53 se fixe au facteur Mdm2 « Murine Double Minute 2 », ce qui conduit à sa dégradation et explique la faible abondance de p53 dans les cellules en bon état. En revanche, lorsque l'ADN est endommagé, trois mécanismes contribuent à une stabilisation de p53 et en conséquence, à une forte augmentation de son activité transcriptionnelle. Tout d'abord, la kinase ATM est activée et phosphoryle Mdm2, inhibant l'interaction Mdm2/p53, ce qui libère et stabilise ainsi p53. Par ailleurs, ATM phosphoryle p53 (directement ou indirectement, par Chk2), renforçant sa stabilité. Enfin, p53 induit la transcription du locus ARF du locus INK4A. La protéine p14^{ARF} se fixe sur Mdm2 et induit sa dégradation rapide, renforçant encore davantage la stabilisation et l'accumulation de p53. L'arrêt de prolifération cellulaire en G1 ou en G2 provient essentiellement d'une induction de p21^{CIP1} et donc de l'inhibition de Cdk2 ou de Cdk1, respectivement.

PARTIE 4 : La Polyploïdie

I- Généralités et définitions

Décrite pour la première fois chez les plantes par L. Guignard (1884) et T. Boveri (1887), la « Polyploïdie » est le fait pour une cellule d'avoir plus de deux ensembles complets de chromosomes. Ainsi une cellule qui possède un seul ensemble complet de chromosomes (n) est dite haploïde alors qu'une cellule diploïde, triploïde ou tétraploïde en possède respectivement deux ($2n$), trois ($3n$) ou quatre ($4n$). Deux types de cellules polyploïdes sont décrits : les « Autopolyploïdes » issus de croisement d'individus de la même espèce ou du doublement de génome d'un même individu par autofécondation ou duplication somatique et les « Allopolyploïdes » issus d'un croisement entre espèces différentes. En revanche, la polyploïdie se différencie de l'aneuploïdie, état cellulaire caractérisé par un gain ou une perte d'un ou plusieurs chromosomes du génome.

Par ailleurs, les cellules polyploïdes dont le matériel génétique est regroupé au sein d'un même noyau sont dites « Mononucléées » alors que celles dont le matériel génétique est réparti dans deux ou plusieurs noyaux sont qualifiées de « Bi/Multinucléées ».

II- La polyploïdie chez les eucaryotes

La polyploïdisation aurait des implications importantes dans l'évolution des eucaryotes (Otto 2007, Jiao et al. 2011) (Fig. 29). En effet, la polyploïdisation est très répandue chez les plantes, en particulier chez les angiospermes dont 60 à 70% des espèces ont un ancêtre polyploïde (Van de Peer et al. 2009). Des espèces cultivées par l'homme, par exemple l'avoine est hexaploïde, des espèces de blé sont tétraploïdes et hexaploïdes, la banane est triploïde, etc. (Huang et al. 2002). Bien que connu pour être une espèce diploïde, le maïs serait allopolyploïde (possession de vestiges de deux génomes distincts) (Moore 1995). Néanmoins, la polyploïdie existe aussi chez des espèces sauvages comme le chêne et le pâturin (Wendel 2000). Les études de « Whole genome duplication (WGD) » ou duplication du génome effectuée récemment chez *Arabidopsis thaliana* (Arabette des dames ou Arabette de Thalius) ont révélé que les mécanismes impliqués sont finement régulés et que la polyploïdisation chez les plantes serait liée à une altération de la méiose (Comai 2005).

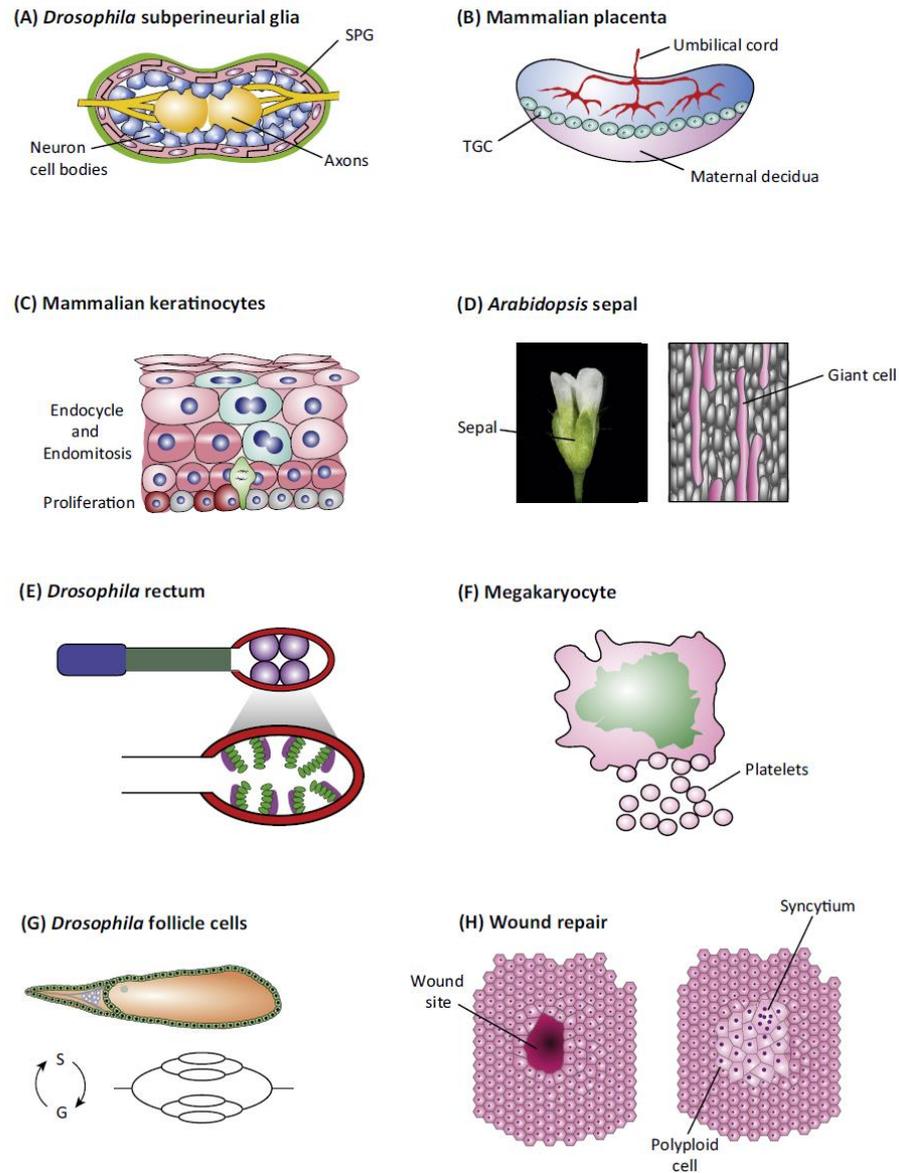


Figure 29 : Exemples de tissus polyploïdes dans différents organes. (A) La taille accrue des SPG (Subperineurial glia) résultant de la polyploïdie est nécessaire pour maintenir la barrière hémato-encéphalique lorsque la masse neuronale augmente au cours du développement. (B) Les cellules géantes du trophoblaste (TGC). (C) Dans les couches supra-basales, les kératinocytes subissent une endomitose (bleu) et l'endocycle (rose) pour augmenter leur ploïdie et leur taille. (D) Dans le sépale de la couche extérieure des fleurs d'*Arabidopsis*, il y a à la fois des cellules géantes, des cellules polyploïdes (cellules roses) et des cellules diploïdes (gris). (E) Le rectum de la *Drosophile* contient quatre papilles composées de cellules polyploïdes qui endocyclent pour produire le nombre requis de cellules polyploïdes dans chaque papille. (F) Les mégacaryocytes ont un noyau (vert) avec un contenu d'ADN jusqu'à $128C$. (G) Les cellules du follicule ovarien de *Drosophila* (en vert) deviennent $16C$ par des endocycles. (H) Dans la cicatrisation des plaies dans l'épiderme de *Drosophila*, des cellules polyploïdes sont produites sur le site de la plaie.

Différentes équipes ont rapporté que, les plantes polyploïdes présentent un avantage sélectif, essentiellement dans des régions où le climat fluctue, de par leur grande hétérozygotie (Paterson 2005, Zhang et al. 2010). En effet, diverses modifications morphologiques (taille des graines), physiologiques (taux de développement) résultant de changements dans l'expression des gènes et dans la structure du génome, seraient induites par les événements de polyploïdisation (Adams et al. 2005 , Comai 2005). Récemment, l'équipe de Salt a démontré la notion d'« Avantage » associée à la polyplôidie, en mettant en évidence que les espèces polyploïdes d'*Arabidopsis thaliana* présentent une meilleure survie associée à une meilleure tolérance à la salinité que les espèces diploïdes (Chao et al. 2013). En effet, une salinité trop élevée des sols inhiberait la division cellulaire, le développement des tiges et des feuilles et induirait des modifications d'expression génique. Sous l'effet du stress salin, les plantes doivent donc se protéger grâce aux mécanismes de tolérance, en particulier grâce à une concentration élevée de potassium qui induit une exclusion du sodium (Munns et al. 2008). Ainsi, l'analyse de la composition en potassium des feuilles de 349 espèces d'*Arabidopsis thaliana* (diploïdes, autotétraploïdes, allotétraploïdes) a révélé qu'une espèce autotétraploïde Wa-1, présente d'une part, un taux plus élevé de potassium et d'autre part, une survie supérieure en comparaison à son homologue diploïde Wa-1-2X. Les auteurs ont ensuite mis en évidence que la ploïdie contrôle la concentration en potassium des feuilles; une espèce haploïde présente une concentration inférieure à celle d'une espèce diploïde, elle-même inférieure à celle d'une espèce tétraploïde (Chao et al. 2013).

La polyplôidisation a également été observée dans le règne des *Fungi*. La levure, *Saccharomyces cerevisiae*, aurait subi il y a, à peu près 100 millions d'années, une duplication de son génome (Fares et al. 2006, Piskur et al. 2006). De plus, des études d'analyse comparative des profils d'expression géniques ont révélé que 2,5% du génome de *Saccharomyces cerevisiae* sont régulés par la polyplôidie (Galitski et al. 1999). Par exemple, lorsque la ploïdie augmente, l'endochitinase CST1, indispensable à la mitose est surexprimée alors que l'expression de la glycoprotéine de surface FLO11 est réprimée (Galitski et al. 1999). D'autres gènes tels que l'actine (GIC2, Cdc42, ...), impliquée dans la morphologie cellulaire sont aussi régulés par la polyplôidie (Galitski et al. 1999). La polyplôidie pourrait donc être à l'origine de variations de l'expression de nombreux gènes et ainsi conférer de nouvelles propriétés physiologiques et morphologiques. Ces modifications génomiques et phénotypiques pourraient expliquer le succès des organismes polyploïdes dans des environnements extrêmes et hétérogènes (Otto et al. 2000 , Lundmark 2006).

Bien que la fréquence des espèces polyploïdes semble moindre chez animaux comparés aux espèces végétales (Otto et al. 2000), des individus polyploïdes ont été retrouvées chez des amphibiens (Schmid et al. 2015), des poissons (Hoegg et al. 2005) et des insectes (Royzman et al. 1998 , Stenberg et al. 2003).

A) Polyplöidisation chez les mammifères

Exceptés les rats *Tympanoctomys barrerae* (entièrement tétraploïde) et *Pipanaoctomys aureus*, retrouvées en Argentine et au Chili (Gallardo et al. 1999 , Gallardo et al. 2006), des organismes entièrement polyploïdes sont extrêmement rares chez les mammifères car ils sont associés à des malformations et une létalité élevée (Otto et al. 2000, Otto 2007). La polyplöidie est d'autant moins courante, qu'elle est restreinte à certains tissus ou organes chez les mammifères. Cette plus faible prévalence ne signifie pas cependant, que l'importance évolutive de la polyplöidisation est moindre chez les mammifères.

Chez les mammifères, les cellules sont en majorité diploïdes, la présence de populations cellulaires polyploïdes a cependant été observée à des fréquences variables dans la moelle osseuse (mégacaryocytes), le cœur (cardiomyocytes), le trophoblaste (cellules géantes), le muscle squelettique (myoblastes), la peau (Kératinocytes) et le foie (hépatocytes) (Orr-Weaver 2015).

Il convient donc de s'interroger sur l'utilité et la finalité fonctionnelle des cellules polyploïdes chez les mammifères. L'acquisition d'un état polyploïde permet-elle simplement la genèse d'une cellule de plus grande taille ou bien modifie-t-elle la physiologie de la cellule en lui conférant des propriétés biologiques spécifiques ?

1- Polyplöidie et Mécanismes

Différents mécanismes de polyplöidisation ont été rapportés chez les mammifères; la fusion cellulaire est le seul mécanisme caractérisé dont aucune étape du cycle cellulaire ne semble être impliquée dans la genèse de cellules polyploïdes. En revanche, les autres mécanismes de polyplöidisation mettent en jeu une altération de la division cellulaire (Fig. 30). Les différentes altérations de la division induisant une polyplöidisation sont : i) Cycle sans mitose ou « Endoreplication » ; ii) Défaut de Mitose ou « Mitotic Slippage » ; iii) Défaut de division cellulaire ou « Cytokinèse incomplète ».

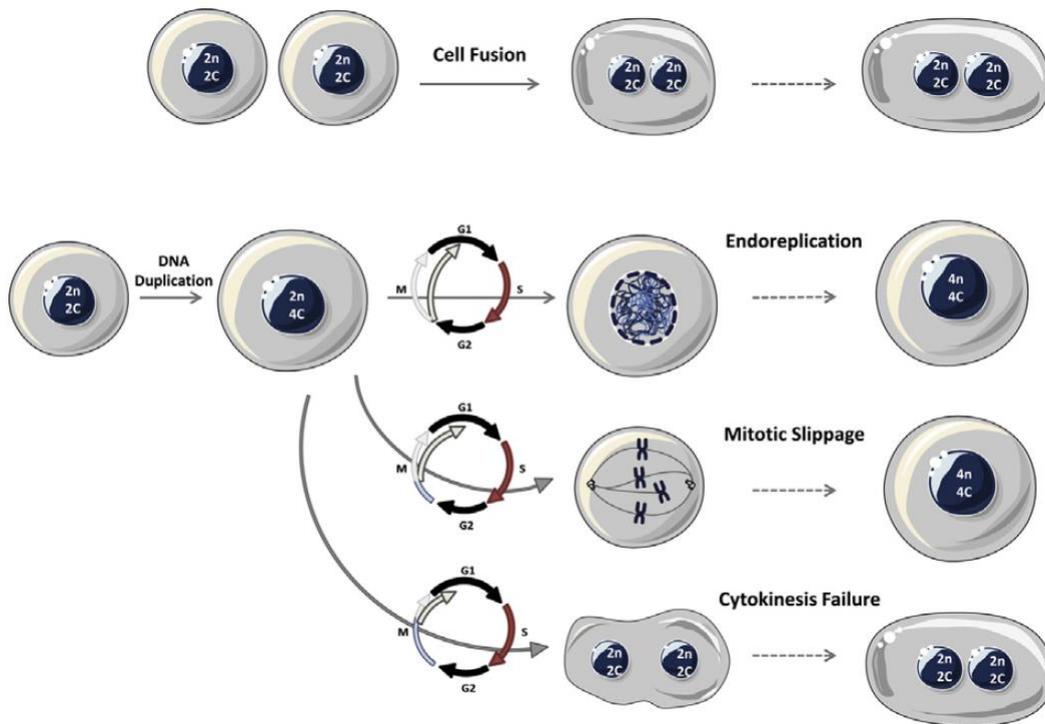
a) La fusion cellulaire

La genèse de cellules polyploïdes est indépendante de la prolifération cellulaire lors de ce processus. Les cellules fusionnent leur membrane et/ou leur noyau, afin de produire respectivement une entité cellulaire mononucléée ou multinucléée. Deux types de fusion sont décrites : la fusion homotypique, entre cellules de même type cellulaire et la fusion hétérotypique, entre cellules de types cellulaires différents (Ogle et al. 2005). Ce mécanisme est essentiel au développement physiologique et à l'homéostasie des tissus osseux (Vignery 2000, Vignery 2008) et des muscles squelettiques (Taylor 2002). Dans ce dernier cas, des myoblastes individuels fusionnent pour former des syncytia capables de produire divers groupes de muscles (Rochlin et al. 2010). Chez l'adulte, la fusion des cellules musculaires est aussi observée lors des processus de régénération et d'entretien du muscle squelettique (Buckingham 2006).

Par ailleurs, la fusion cellulaire a été rapportée dans divers processus pathologiques impliquant notamment les propriétés fusogéniques de virus, tels que les virus de l'hépatite B et C (VHB, VHC), l'EBV (« Virus d'Epstein-Barr »), le virus herpès associé au sarcome de Kaposi (KSHV) (Gao et al. 2011). Différents travaux ont montrés que l'expression des glycoprotéines E5, E6 et E7 du HPV induisaient la fusion entre les cellules épithéliales du col de l'utérus (Hu et al. 2009). Ce seul évènement ne semble toutefois pas suffisant pour induire la carcinogénèse (Duelli et al. 2007). En revanche, la surinfection par le virus herpès agirait comme un cofacteur dans la tumorigénèse du col de l'utérus (Roden et al. 2006). En effet, cette infection secondaire induirait la fusion de cellules, préalablement infectées par le virus HPV, et conduirait à la genèse de cellules tétraploïdes chromosomiquement instables (Ried et al. 1999).

b) L'endoréplication (transition G2/M)

L'endoréplication est un cycle cellulaire particulier, sans caryodiérèse ni division cytoplasmique, qui aboutit à la genèse d'une cellule tétraploïde mononucléée. Les cellules enchaînent des cycles de croissance (phase G1) et de réplication de l'ADN (phase S) soit sans effectuer la mitose, on parle d'endocycle, soit avec une mitose partielle, il s'agit d'endomitose. La mise en place de ce cycle particulier est souvent due à une dérégulation du point de contrôle de la transition G2/M pour les endocycles et celle du point de contrôle de la mitose pour les cycles d'endomitose.



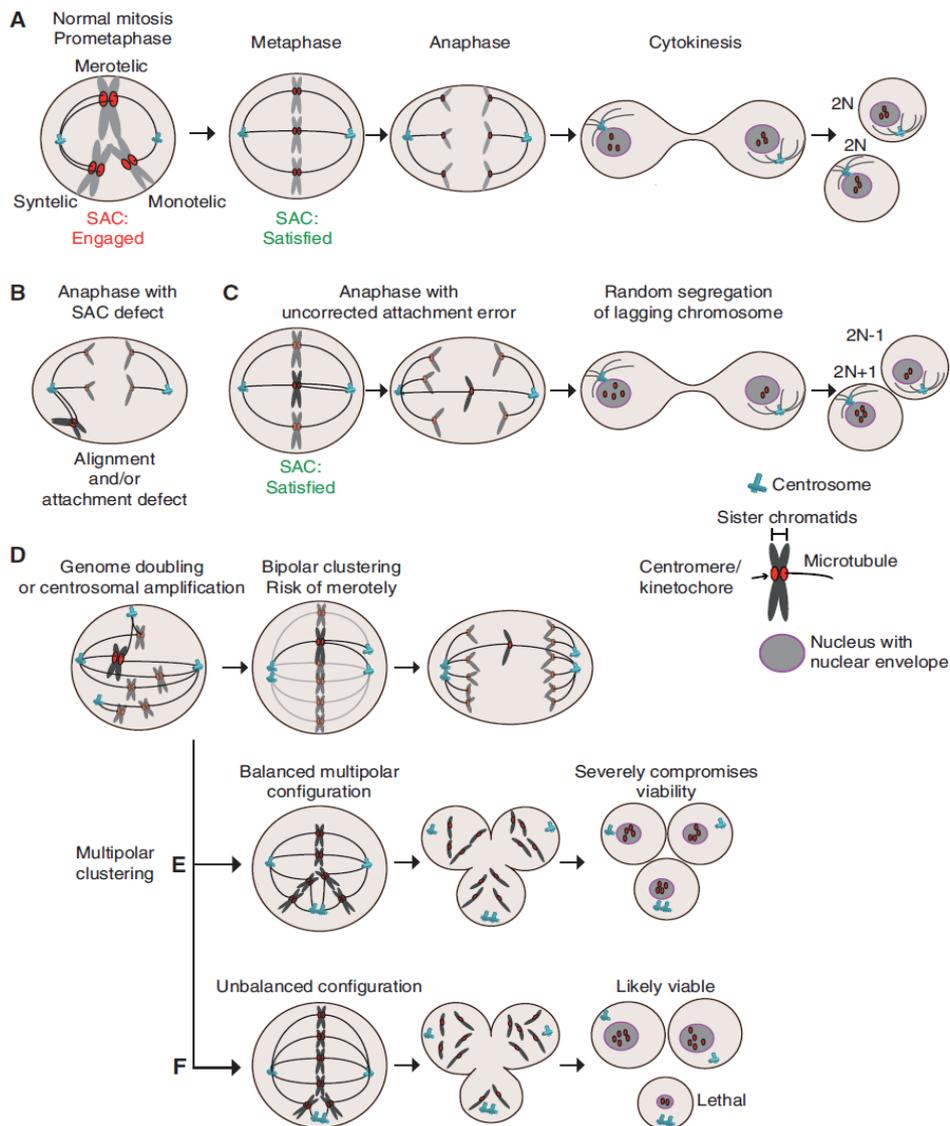
Tiré de la revue de Géraldine Gentric et Chantal Desdouets. *The American Journal of Pathology* 2014.

Figure 30 : Mécanismes conduisant à la genèse de cellules tétraploïdes. Les cellules tétraploïdes peuvent être générées par fusion cellulaire ou des cycles cellulaires abortifs après la réplication de l'ADN : endoréplication, glissement mitotique ou cytokinèse incomplète. Bien que la fusion cellulaire et la cytokinèse incomplète induisent des descendants binucléés, l'endoréplication et le glissement mitotique génèrent des cellules mononucléées (absence de division nucléaire). (c) : nombre de chromatids; (n) : nombre de chromosomes.

Des exemples d'endocycles ont notamment été caractérisés dans les cellules géantes de trophoblastes (TGC) chez les mammifères. Les endocycles jouent un rôle crucial dans l'implantation de l'œuf fertilisé dans l'utérus. Dans ce système, l'endocycle est associé à une diminution de la traduction de la cycline B. Par contre, la genèse des cellules TGC est associée à l'activation de l'inhibiteur de kinase p57 et à l'inactivation du facteur FGF4 « Fibroblast Growth Factor 4 » (Ullah et al. 2008). Conjointement, ces deux événements entraînent un défaut d'activité du complexe Cdk1/cycline B à la transition G2/M (MacAuley et al. 1998). L'ensemble de ces processus conduit ainsi la genèse de cellules polyploïdes ayant un contenu en ADN pouvant être mille fois supérieur à la normale. Des facteurs appartenant à la famille des facteurs de transcription E2F ont également été montrés comme jouant un rôle essentiel dans la polyploïdisation des TGC (Lammens et al. 2008).

Des cas d'endomitose ont été observés dans les mégacaryocytes, cellules précurseurs des plaquettes (Ravid et al. 2002). Bien que ces cellules atteignent la métaphase ou l'anaphase A, aucune séparation des chromatides soeurs ou processus de cytokinèse ne sont jamais observés (Vitrat et al. 1998). L'ensemble de ces modifications de cycle conduit à la formation d'une cellule avec un noyau polyploïde globuleux pouvant atteindre 128n. Cette polyploïdisation des mégacaryocytes passerait par des régulations des niveaux de Cdk1/Cycline B (Nguyen et al. 2010) et des facteurs d'échange de guanine spécifiques RhoA (Gao et al. 2012). De plus, diverses études ont rapporté une réduction de la durée de la phase G1 lors du processus d'endomitose des mégacaryocytes, cette réduction étant corrélée à une surexpression de la cycline E (Carow et al. 2001). Des données récentes montrent que l'action de la cycline E passerait par un contrôle de l'expression des composants du complexe de pré-réplication (Mcm2 et Cdc6) (Eliades et al. 2010). Dans ces conditions, la cellule peut s'engager rapidement dans un nouveau cycle de synthèse d'ADN.

De nombreux travaux soulignent également l'importance des cycles d'endoréplication dans la genèse de cellules polyploïdes, suite à des lésions de l'ADN, notamment lors de l'attrition des télomères (structures localisées aux extrémités des chromosomes), (Davoli et al. 2010, Davoli et al. 2011, Varetta et al. 2012, Fox et al. 2013). Plusieurs voies participent à la réparation des dommages à l'ADN, la plus connue et caractérisée étant la voie ATM/ATR – Chk1/Chk2 « DNA damage Checkpoint ». Brièvement, l'activation de cette voie se traduit par un ralentissement du cycle cellulaire afin de permettre une réparation de l'ADN, au cas échéant, les cellules sont orientées vers l'apoptose ou la sénescence (van Attikum et al. 2009). Des travaux récents ont permis de montrer que l'activation de ce « DNA damage checkpoint » suite



Adapté de la revue de Laurent Sansregret and Charles Swanton. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2017.

Figure 31 : Défauts de mitose et Aneuploïdie. (A) Les attachements incorrectes activent le point de contrôle SAC pour retarder l'entrée en anaphase. Les mis-attachements mérotéliques activent peu le point de contrôle, mais les mécanismes de correction d'erreur contribuent à la formation d'attaches bipolaires correctes (amphilétiques) avant la séparation des chromosomes à l'anaphase. (B) Les cellules avec une activité SAC compromise peuvent entrer en anaphase avec différents défauts d'attachement. (C) Les attachements mérotéliques non corrigés conduisent à des chromosomes retardant l'apparition de l'anaphase, provoquant une ségrégation aléatoire et à la formation de cellules filles aneuploïdes. (D) Une amplification du nombre de centrosome lors de la mitose créent un fuseau multipolaire transitoire. (E) Le centrosome supplémentaire peut entraîner une anaphase multipolaire créant de manière aléatoire, des cellules filles dépourvues de plusieurs chromosomes. (F) Le regroupement aléatoire des centrosomes peut créer un fuseau fonctionnel qui se fixe uniquement à quelques chromosomes, ce qui pourrait entraîner une aneuploïdie viable dans 2 cellules sur 3. Les exemples en D et E sont particulièrement bien tolérés par les cellules tétraploïdes.

à un dommage persistant des télomères, se traduit par un arrêt en phase G2/M via une inactivation du complexe Cdk1/Cycline B1 (Davoli et al. 2010, Davoli et al. 2012). Toutefois, les cellules sont capables de ré-entrer en phase G1 du cycle et de progresser en phase S, notamment par l'effet conjoint d'une dégradation de la géminine, inhibiteur de la réplication, et d'une ré-expression de Cdt1 responsable du « Licensing » des origines de réplication. L'ensemble de ces événements participent ainsi à la genèse de cellules tétraploïdes.

Ces cellules tétraploïdes formées sont normalement éliminées par apoptose ou sénescence (Davoli et al. 2010). En revanche, dans un contexte p53 déficient, ces cellules peuvent ré-entrer en phase S, avec un matériel génétique tétraploïde (4n) et progresser de nouveau jusqu'en phase G2/M. L'activation permanente du « DNA damage checkpoint » provoque une polyploïdisation induite par des cycles répétés d'endoréplication.

c) Le glissement mitotique « Mitotic slippage » (en métaphase)

Ce mécanisme est lié à une altération du point de contrôle SAC (« Spindle Assembly Checkpoint ») et n'est jamais observé au cours de processus physiologiques. Brièvement, SAC est un complexe protéique (Mad2, Bub1, BubR1, Bub3...) qui vérifie la bonne fixation des kinétochores des chromosomes aux microtubules afin de garantir une parfaite répartition du matériel génétique entre les futures cellules filles lors de l'anaphase (Fig. 31). Dans le cas contraire, l'activation de SAC empêche l'entrée en anaphase des cellules, par séquestration de Cdc20, activateur du complexe APC/c. Le point de contrôle SAC peut cependant être défaillant. Les cellules bloquées en métaphase se défont lentement du blocage et entrent de nouveau en phase G1 sans effectuer ni anaphase ni cytokinèse générant des cellules tétraploïdes mononucléées (Rieder et al. 2004 , Musacchio et al. 2007). Les travaux de l'équipe de Rieder montrent que suite à un arrêt prolongé en métaphase induite par SAC, la cycline B1 est progressivement dégradée jusqu'à un seuil limite où la cellule reforme une membrane nucléaire englobant l'ensemble des chromosomes et amorce ainsi la sortie de mitose et donc la genèse d'un contingent cellulaire polyploïde (Brito et al. 2006).

Des dérégulations de l'intégrité de SAC ont été caractérisées dans divers processus pathologiques, notamment dans le cancer du côlon. Les cancers colorectaux caractérisés par une forte instabilité chromosomique et la formation de tumeurs aneuploïdes, sont associés aux mutations du gène APC « Adenomatous Polyposis Coli » (Polakis 1997 , Kaplan et al. 2001). En partenariat avec la protéine EB1, la protéine APC joue un rôle dans la stabilité des

microtubules en s'associant à leurs extrémités positives (Nakamura et al. 2001 , Nathke 2004). En effet, des anomalies du fuseau mitotique et des aberrations chromosomiques ont été observées dans des cellules souches embryonnaires déficientes en APC ($APC^{-/-}$) (Fodde et al. 2001 , Kaplan et al. 2001). Des travaux récents, ont montré que des mutations d'APC induisent une perte de la tension émise aux kinétochores au moment de la métaphase, provoquant une altération de la progression en anaphase (Dikovskaya et al. 2007 , Kroboth et al. 2007). Comme évoque précédemment, les cellules mononucléées tétraploïdes ($4n$) sont normalement rendues inactives ou éliminées par activation du point de contrôle p53. Il se fait que, la carcinogenèse APC-dépendante est souvent associée à une perte de l'expression de p53. La persistance de ces cellules tétraploïdes favorise ainsi, la genèse de contingents aneuploïdes et donc l'apparition d'une instabilité chromosomique.

d) La cytokinèse incomplète

Comme décrit dans les chapitres précédents (cycle cellulaire), la cytokinèse est un processus qui mobilise une panoplie de protéines dont la dérégulation peut induire l'absence de division cytoplasmique et par conséquent favoriser l'émergence d'une tétraploïdisation cellulaire (cellule bi/multinucléée). Longtemps décrite comme exclusivement liée à une division pathologique, de récentes études ont démontré que la cytokinèse incomplète est aussi un processus programmé dans le développement physiologique de certains tissus comme le cœur (Li et al. 1996), la moelle osseuse (Zimmet et al. 2000), et le foie (Margall-Ducos et al. 2007) (voir détail dans le chapitre polyploïdie et foie). Par exemple, chez les mammifères, la transition hyperplasie-hypertrophie observée respectivement durant les développements embryonnaire et post-natal du cœur, est marquée chez certaines espèces, par une tétraploïdisation cellulaire associée à un défaut de cytokinèse (Engel et al. 2006). A l'âge adulte, les cardiomyocytes tétraploïdes binucléés représentent environ 60% de la population cellulaire du tissu cardiaque chez l'homme et 85% chez le rat (Brodsky et al. 1980). Plusieurs études ont révélé qu'une diminution drastique après la naissance, de l'expression des kinases « Rock » et citron, effecteurs de RhoA, conduisent notamment à une inhibition de l'activité motrice de la myosine II et donc à l'inhibition de la contraction de l'anneau contractile (Ahuja et al. 2007). D'autres travaux ont également montré qu'une localisation anormale de l'Anilline dans les cardiomyocytes conduirait à la formation d'un anneau contractile partiel et à une ingression asymétrique du sillon de division à la transition anaphase/télophase (Engel et al. 2006). Par ailleurs, une corrélation entre la présence d'une polyploïdie tissulaire induite par des processus

de cytokinèse incomplète et une surexpression de kinases mitotiques (Aurora A, B et Polo kinases), a été observée par exemple dans des tumeurs pancréatique, cervicale, du côlon, de l’ovaire et du sein (Lehman et al. 2007).

2- Les avantages de la polyploïdie

a) Polyploïdie et protection génique

L’une des conséquences de la polyploïdisation serait tout simplement l’amplification génique. Cette caractéristique pourrait représenter un avantage, dès lors que, si une des copies (ou allèle) d’un gène est endommagée, alors les copies restantes pourront contrecarrer cette lésion (Schwarze et al. 1984 , Otto et al. 2000). Par ailleurs, les cellules polyploïdes ont de plus fortes probabilités de porter un allèle bénéfique pour un tissu qu’une cellule diploïde et réciproquement la polyploïdie pourra masquer l’effet délétère d’une mutation par rapport à un génome diploïde (Otto et al. 2000). Cette particularité serait spécialement utile à un organe comme le foie qui de par ses fonctions, est exposé à de nombreux génotoxiques.

b) Polyploïdie et réorientation du tissu

La genèse de cellules polyploïdes serait indispensable à divers processus développementaux tels que l’embryogenèse, la différenciation cellulaire et la régénération tissulaire et résulterait en la formation de cellules hautement différenciées. Ainsi, depuis maintenant quelques années, la polyploïdisation a été associée à une réorientation fonctionnelle du tissu. Les mégacaryocytes de la moelle osseuse représentent l’un des cas les mieux décrits dans la littérature. En effet, suite à la polyploïdisation, les mégacaryocytes deviennent capable de produire des plaquettes (Ravid et al. 2002 , Trakala et al. 2015); chez l’homme, par exemple, on observe une diminution drastique de l’expression des protéines impliquées dans la réplication de l’ADN (MCM et Cdc6) et dans la prolifération (E2F1 et Cdk1), au profit d’une augmentation d’expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la formation et la fonction des plaquettes (glycoprotéines spécifiques des plaquettes, facteurs de coagulation, protéines du cytosquelette) (Ravid et al. 2002 , Raslova et al. 2007). Des observations similaires ont été faites dans d’autres tissus : les kératinocytes et les cellules géantes du trophoblaste grâce à leur hyperplasie, participent et augmentent l’efficacité des barrières de la peau et du placenta respectivement (Zanet et al. 2010 , Chen et al. 2012, Gandarillas et al. 2014). De plus, la comparaison du profil

d'expression génique des cellules diploïdes et polyploïdes dans les tissus hépatique et cardiaque par l'équipe de Vinogradov, a mis en évidence un lien clair entre la polyploïdie et l'obtention d'une meilleure survie cellulaire en conditions délétères (Anatskaya et al. 2007 , Anatskaya et al. 2010). Le profil transcriptomique des cardiomyocytes polyploïdes, passe d'une activation de gènes codant pour des protéines consommatrices d'énergie vers des protéines économes en énergie. Dans le foie, l'étude comparative de l'expression de gènes issus d'un foie polyploïde par rapport à un foie diploïde révèle une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la protection cellulaire, la prolifération, la réparation de l'ADN, l'hypoxie et le métabolisme lipidique.

c) Polyploidie et sénescence cellulaire

La polyploïdie est souvent associée à un état de différenciation terminale et de sénescence (Brodsky et al. 1977). Avec l'âge, de nombreux types cellulaires présentent une augmentation de leur niveau de ploïdie, corrélée avec l'acquisition d'un état sénescence. La sénescence représenterait un processus cellulaire « protecteur » permettant à un tissu de conserver une cellule polyploïde hautement différenciée, possédant des propriétés biologiques essentielles, mais qui serait moins en mesure de répondre à un stimulus prolifératif. Dans le cas des cellules musculaires lisses des vaisseaux (CMLV), l'augmentation du statut polyploïde a été rapportée dans le tissu aortique de rats âgés par rapport à des rats jeunes, soulignant un lien entre vieillissement et polyploïdie (Yang et al. 2007). Par ailleurs, dans ces CMLV, des marqueurs de sénescence, tels que l'augmentation de l'expression de p16^{INK4a} (Chien et al. 2006), de l'activité β -galactosidase (SA- β -gal) (Dimri et al. 1994, Dimri et al. 1995) ou bien une incapacité à proliférer (Yang et al. 2007), ont été observées. La sénescence est de ce fait, considérée comme un mécanisme suppresseur de tumeur (Campisi 2005 , Campisi 2005 , Campisi et al. 2007).

3- La polyploïdie « Le côté obscur de la force »

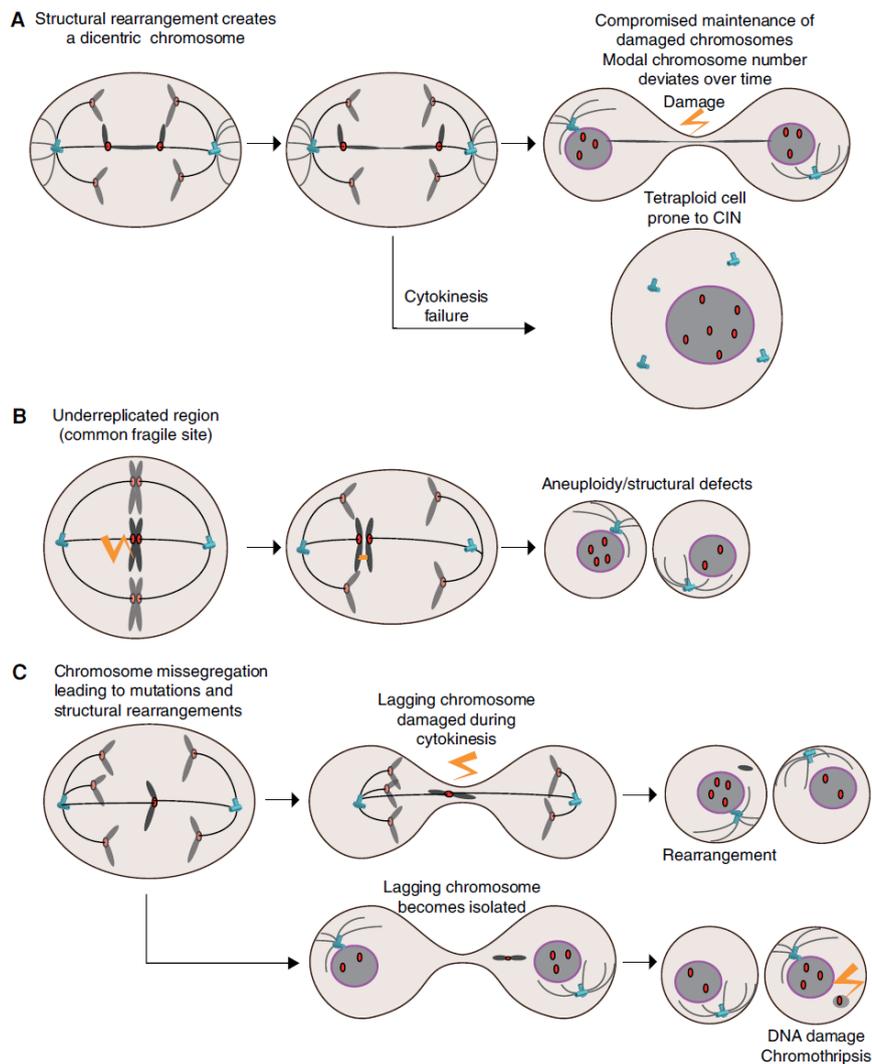
a) Polyploidie, aneuploidie et pathologie

Comme évoqué précédemment, l'acquisition d'un statut polyploïde confère aux cellules et aux tissus dans lequel elle s'installe, des avantages en termes d'adaptabilité environnementale, de métabolisme, de diversification génétique, etc. Ceci est toutefois, associé à des programmes

développementaux précis et à l'acquisition d'un phénotype de cellule hautement « Spécialisée ». En parallèle, la polyplôïdie peut induire des amplifications géniques non programmées au sein d'un tissu.

L'une des premières hypothèses, celle de Théodore Boveri en 1929, stipule qu'une cellule tétraploïde représenterait un intermédiaire génétiquement instable pouvant favoriser le développement de cancer. Plus récemment, plusieurs études ont démontré que de la transition « polyplôïdie-aneuploïdie » serait à l'origine d'instabilité chromosomique (CIN) participant au processus de tumorigenèse (Davoli et al. 2011). Dans les stades précoces de développement des cancers de l'utérus, du sein, du colon ou bien de l'œsophage, l'apparition de populations cellulaires tétraploïdes a été fréquemment rapportée et précéderait l'apparition de cellules aneuploïdes et le développement de tumeurs. L'exemple le plus probant du potentiel oncogénique des cellules polyplôïdes est sans doute la démonstration faite par l'équipe de David Pellman, qui a montré que la transplantation dans des souris Nude, de cellules épithéliales mammaires rendues artificiellement tétraploïdes après traitement à la dihydrocytochalasine, était suffisante pour induire la formation de tumeurs, dans un contexte $p53^{-/-}$ (Fujiwara et al. 2005). Ces tumeurs présentaient par ailleurs des aberrations chromosomiques structurales et numériques indiquant ainsi le rôle de la tétraploïdie dans l'instabilité génomique. A l'inverse, la transplantation dans les mêmes conditions de cellules diploïdes isogéniques, ne génère aucune tumeur.

Par ailleurs, différentes études ont rapporté qu'une mauvaise ségrégation des chromosomes gouvernerait la transition « polyplôïdie-aneuploïdie ». En effet, une cellule polyplôïde doit non seulement être capable de gérer un contenu en ADN augmenté, mais aussi la présence de centrosomes surnuméraires (2 en phase G1 et 4 à l'entrée en mitose). Depuis, divers travaux *in vivo* et *in vitro* ont démontré que la présence de centrosomes surnuméraires est une caractéristique constante des tumeurs aneuploïdes (Kronenwett et al. 2005, Nigg 2006, Pihan 2013). Dans certains cancers hématologiques et tumeurs solides, l'amplification du centrosome serait une étape précoce de la pathologie et corrèlerait notamment avec le grade de la tumeur, l'index de prolifération et le niveau d'instabilité génomique (Lingle et al. 2002, Giehl et al. 2005, Chng et al. 2008). La présence de centrosomes surnuméraires favoriserait la formation d'un fuseau mitotique multipolaire, au détriment du fuseau bipolaire classique, induisant ainsi des défauts de ségrégation des chromosomes et par conséquent la genèse de descendants aneuploïdes (Fig. 31) (Nigg 2002, Vitre et al. 2012). Un « clustering » des centrosomes surnuméraires permettant la formation d'un fuseau bipolaire au lieu d'un fuseau



Adapté de la revue de Laurent Sansregret and Charles Swanton. Cold Spring Harb Perspect Med 2017.

Figure 32 : Interaction entre l'instabilité totale du chromosome (wCIN), le CIN structurel (sCIN) et l'instabilité génomique (GIN). (A) Les réarrangements structurels causés par le stress de réplication avant la mitose crée des chromosomes dicentriques. Les chromosomes dicentriques peuvent également empêcher la cytokinèse. (B) Le stress réplicatif dans les sites fragiles communs peut déclencher la réplication de l'ADN pendant la mitose conduisant à la formation de cellules aneuploïdes suite à des défauts structurels. (C) Formation de cellules aneuploïdes et de micronuclei suite à des événements de chromosomes « Lagging » au cours de la cytokinèse.

multipolaire, a cependant été observé dans certaines cellules cancéreuses (Quintyne et al. 2005 , Basto et al. 2008) induisant la remise en question de l'hypothèse initiale. Ce mécanisme a d'ailleurs été décrit par l'équipe de Desdouets, lors de la polyploïdisation physiologique du foie chez le rat (Guidotti et al. 2003). Ces résultats rapportés par différents groupes semblent indiqués la présence de mécanismes additionnels.

Depuis quelques années, de nombreux travaux ont proposé les attachements mérotéliques comme pouvoyeur majeur d'aneuploidie (Ganem et al. 2009 , Silkworth et al. 2009). Ces attachements mérotéliques se caractérisent par le fait qu'un des deux kinétochores est attaché aux microtubules émanant des deux pôles du fuseau mitotique. Ces attachements mérotéliques sont particulièrement dangereux car peu détectés par le point de contrôle SAC (« Spindle assembly checkpoint »). Les défauts non corrigés conduisent à une ségrégation anormale des chromosomes aux deux pôles en anaphase, due à un retard d'alignement de ces chromosomes : on parle de « Lagging » (Salmon et al. 2005 , Cimini 2008 , Ganem et al. 2009). Ces « Lagging » chromosomes exclus des deux noyaux filles deviennent des entités nommées « Micronoyaux » (Fig. 32). Les chromosomes piégés dans ces micronoyaux accumulent des niveaux élevés de cassures de l'ADN, lors des cycles prolifératifs ultérieurs induisant une aneuploidie (Fig. 32) (Ganem et al. 2009). Ces différentes données indiquent donc que les cellules polyploïdes peuvent proliférer et générer des descendants aneuploïdes.

Il y a quelques années, de nombreuses études proposèrent le « Tetraploid checkpoint » et la protéine p53 comme point de contrôle de la transition « polyploïdie-aneuploïdie ». Brièvement, p53 activée bloque les cellules tétraploïdes nouvellement générées en phase G1 du cycle et les oriente soit vers une mort par apoptose soit vers la sénescence (Andreassen et al. 2001 , Rieder et al. 2004 , Ganem et al. 2007). L'intégrité du « Tetraploid checkpoint » a cependant été remise en cause et divers travaux montrent qu'en fonction du type cellulaire, ce dernier peut se révéler plus ou moins permissif (Guidotti et al. 2003 , Uetake et al. 2004 , Fujiwara et al. 2005 , Shi et al. 2005).

b) Les acteurs de la polyploïdie pathologique

En réponse à un stress (génotoxique, métabolique) ou une atteinte tissulaire, la genèse de contingents cellulaires polyploïdes est induite. Ainsi, différentes études ont observé des populations polyploïdes dans les cellules des muscles lisses utérins lors de la grossesse (van der Heijden et al. 1975), dans les cellules musculaires cardiaques et des muscles lisses des vaisseaux

(CMLV) lors de l'hypertension (Vliegen et al. 1995 , Hixon et al. 2000), dans les cellules thyroïdiennes lors d'une hyperthyroïdie (Auer et al. 1985). L'infection virale constitue aussi un facteur majeur de modulation de la polyploïdie. Dans le tissu utérin, un rôle important du HPV dans l'émergence de cellules tétraploïdes a été décrit (Incassati et al. 2006). Des changements de la ploïdie hépatique ont également été rapportés pour des pathogènes tels que *plasmodiums falciparum* et *yoelii*, agent de la malaria (Austin et al. 2014), les virus hépatites B et C (Toyoda et al. 2005). Plus récemment, une fréquence élevée d'aneuploïdie (monosomie, trisomie, polyploïdie) a été observée dans les cellules infectées par le virus zika (Souza et al. 2016). Enfin, il est important de souligner que des modifications pathologiques de la polyploïdie de certains tissus constituent une étape précoce dans la progression tumorale. Dans le cadre du cancer du sein, du poumon, du côlon, du pancréas ou bien du syndrome de Barrett (oesophage), l'émergence de populations cellulaires tétraploïdes (source d'aneuploïdie et d'instabilité chromosomique) est observée dans les stades précoces de développement des tumeurs (Davoli et al. 2011).

B) Le foie, un organe polyploïde

1- Polyploïdie et développement postnatal du foie

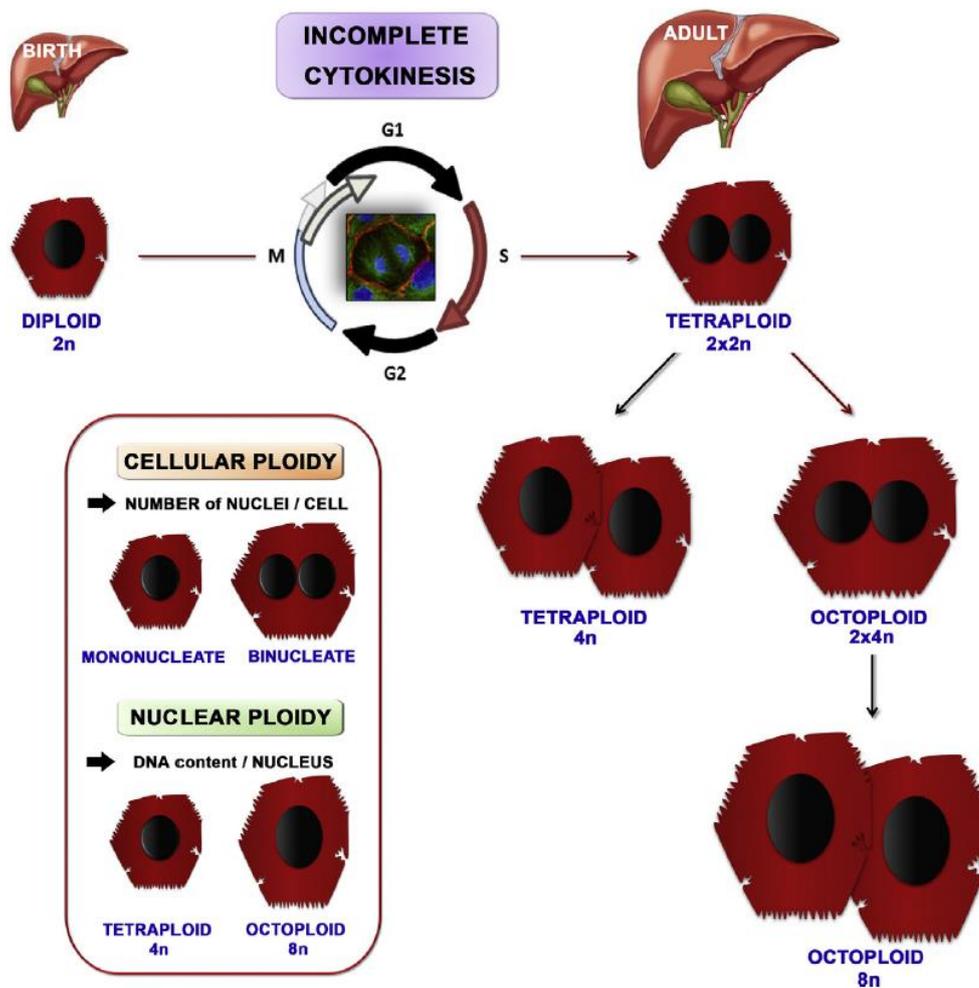
L'émergence d'une polyploïdie hépatique accompagne le début de la maturation postnatale du foie (Sigal et al. 1999 , Gupta 2000). Au cours de la période périnatale et les quatre premières semaines après la naissance, les hépatoblastes acquièrent des fonctions d'hépatocytes différenciés et cette période développementale est corrélée à une baisse significative de la prolifération cellulaire mais aussi par l'émergence de différentes classes d'hépatocytes polyploïdes (Epstein 1967, Guidotti et al. 2003). En effet, après la naissance, le foie est presque exclusivement constitué d'hépatocytes diploïdes ($2n$). La polyploïdisation hépatique commence au cours des trois premières semaines après la naissance et constitue en la génération successive d'hépatocytes tétraploïdes, binucléés ($2 \times 2n$) ou mononucléés ($4n$) (Guidotti et al. 2003 , Margall-Ducos et al. 2007) (Fig. 33). Les 2^{ème} et 3^{ème} mois après la naissance, sont marqués par la genèse et l'accumulation d'hépatocytes octoploïdes (binucléés $2 \times 4n$ et mononucléés $8n$). Ces populations augmentent avec l'âge mais n'excèdent pas 5 à 7% de la population totale (Seglen 1997). Une deuxième vague de polyploïdisation a également été observée lors du vieillissement chez différentes espèces (Severin et al. 1984 , Kudryavtsev et al. 1993).

Le degré de polyploïdisation hépatique varie entre les mammifères (Celton-Morizur et al. 2010 , Duncan et al. 2012). Ainsi, chez l'adulte, 80 à 90% des hépatocytes de souris C57BL sont polyploïdes (Duncan et al. 2010 , Pandit et al. 2012), 70 à 80% chez le rat (Gandillet et al. 2003, Margall-Ducos et al. 2007) et plus de 20% chez l'homme (Kudryavtsev et al. 1993 , Seglen 1997 , Toyoda et al. 2005, Duncan et al. 2012). De nombreux travaux soulignent par ailleurs l'existence d'une corrélation inverse entre l'index mitotique dans le foie et le niveau de polyploïdie hépatocytaire trouvé chez différentes espèces (Wheatley 1972 , Anatskaya et al. 1994). Par exemple, le foie de souris possède un index mitotique beaucoup plus faible que le foie de rat et un plus haut niveau de polyploïdie est retrouvé dans le foie murin.

2- Mécanismes de la polyploïdie physiologique du foie

Au cours du développement postnatal du foie, l'échec de cytokinèse est le mécanisme principal de la polyploïdisation des hépatocytes. Comme évoqué précédemment, une cytokinèse complète donne lieu à deux hépatocytes diploïdes alors qu'une cytokinèse incomplète (échec de cytokinèse) génère un hépatocyte tétraploïde avec deux noyaux diploïdes ($2 \times 2n$) (Guidotti et al. 2003 , Margall-Ducos et al. 2007). Cet hépatocyte est capable de ré-entrer dans le cycle et de subir une cytokinèse complète donnant deux hépatocytes tétraploïdes mononucléés ($4n$). Cependant, si la cytokinèse échoue à nouveau durant la mitose de ces derniers, des hépatocytes binucléés octoploïdes ($4 \times 4n$) seront générés. Ainsi, une polyploïdisation progressive avec la formation de cellules à un ou deux noyaux tétra ou octoploïdes apparaît successivement dans le parenchyme hépatique. Ces dernières années, différentes études effectuées par l'équipe de Desdouets, ont rapporté que l'échec de cytokinèse est régulé par les voies insuline et PI3-K/AKT (Celton-Morizur et al. 2009, Celton-Morizur et al. 2010 , Celton-Morizur et al. 2010). Ces études ont démontré chez les rongeurs, que la réduction du taux d'insuline circulant entraîne la baisse de production d'hépatocytes binucléés ($2 \times 2n$) tandis que ce nombre augmente significativement lorsque le taux d'insuline est élevé. De plus, ces auteurs ont démontré que l'inhibition de la phosphorylation de PI3-K/AKT, bloque l'échec de cytokinèse et favorise la polarisation de l'actine, une réorganisation du cytosquelette et le recrutement de la protéine RhoA indispensable à la cytokinèse.

Récemment, d'autres facteurs contribuant à la polyploïdisation du foie, ont été rapportés dans différents travaux. Par exemple, les facteurs de transcription E2F ont été décrits comme indispensables à la polyploïdisation des hépatocytes au cours du développement du foie après



Adapté de la revue de Manon Fortier et Collaborateurs. Methods in Cell Biology 2017.

Figure 33 : A la naissance, les hépatocytes sont exclusivement diploïdes (mononucléés $2n$). Au cours du développement du foie postnatal, après le sevrage, les hépatocytes mononucléés $2n$ peuvent s'engager soit dans un cycle de division cellulaire normal, ce qui donne naissance à deux hépatocytes $2n$ mononucléés, soit un cycle cellulaire adaptatif avec un défaut de cytokinèse donnant lieu à un hépatocyte tétraploïdes binucléés ($2 \times 2n$). Par ce processus, la polyploïdisation progressive a lieu dans le parenchyme du foie et des classes de cellules tétraploïdes et octoploïdes avec un ou deux noyaux sont formés. Les hépatocytes polyploïdes sont ensuite caractérisés par le nombre de noyaux par cellule (ploïdie cellulaire) ainsi que par le contenu en ADN de chaque noyau (ploïdie nucléaire).

la naissance. En effet, la déficience en E2F8 induit l'expression de gènes favorisant la cytokinèse, ce qui empêche la polyploïdisation du foie. En revanche, une déficience en E2F1 inhibe la cytokinèse et augmente la polyploïdisation hépatique. L'extinction chez la souris, de l'expression des facteurs régulateurs du cycle cellulaire tels que Cdk1, Skp2, cycline E2, p21, p53, pRb, Survivine, Ssu72 et ERCC1 (impliqué dans la réparation de l'ADN) entraîne une augmentation de la polyploïdisation par contre l'inhibition de l'expression de la cycline E1 réprime la polyploïdie hépatique (Chipchase et al. 2003 , Nevzorova et al. 2009 , Li et al. 2013). De façon intéressante, une étude récente de l'équipe de Duncan, a rapporté que l'expression de miR-122 est non seulement indispensable mais également suffisante pour la polyploïdisation hépatique (Hsu et al. 2016). En effet, grâce à un modèle de souris miR-122 KO inductible spécifiquement dans le foie, les auteurs ont démontré que l'inhibition de l'expression de miR-122 induit la baisse du nombre d'hépatocytes polyploïdes alors que cette observation est réversée lorsque miR-122 est surexprimé. Ainsi, miR-122 agirait comme un antagoniste des effecteurs pro-cytokinèses tels que Cux1, RhoA, Mapre1, Iqgap1, Nedd4I et Slc25a34, conduisant à une cytokinèse incomplète et à une expansion d'hépatocytes binucléés.

3- Polyploïdie dans le foie vieillissant et réversion

L'existence d'une 2^{ème} vague de polyploïdisation au cours du vieillissement, a été rapportée par différents travaux (Kudryavtsev et al. 1993, Chipchase et al. 2003 , Wang et al. 2014). La majorité des hépatocytes sont diploïdes chez des individus jeunes (Duncan et al. 2012) avec un nombre relatif d'hépatocytes polyploïdes n'excédant généralement pas 15% chez des hommes âgés de 20 ans (Kudryavtsev et al. 1993). Toutefois, cette fraction d'hépatocytes polyploïdes augmente pour atteindre 42% chez un adulte de 80 ans (Kudryavtsev et al. 1993). Une étude de l'équipe de Hu, a montré que la fraction d'hépatocytes octoploïdes passe du simple au double entre des souris de 2 mois et des souris âgées de 18 mois (Wang et al. 2014). Cette équipe a également observé dans des souris âgées de 18 mois, une corrélation entre l'augmentation des contingents cellulaires hautement polyploïdes et l'expression élevée de marqueurs associés à la sénescence tels que β -galactosidase, p16, p21 et p53 (Wang et al. 2014). De plus, chez les souris âgées, l'expression de ces marqueurs est significativement plus élevée dans les hépatocytes octoploïdes comparés aux hépatocytes diploïdes et tétraploïdes (Wang et al. 2014). La polyploïdisation des hépatocytes au cours du vieillissement a donc été suggérée comme une manifestation de la sénescence des hépatocytes.

De façon intéressante, la capacité régénérative du foie après hépatectomie partielle est diminuée chez les animaux âgés ayant une proportion élevée d'hépatocytes polyploïdes et de marqueurs de sénescence (Gerlyng et al. 1993 , Sigal et al. 1999 , Celton-Morizur et al. 2010). De plus, il est important de noter que, les études de repeuplement du foie dans le modèle de souris *Fah^{-/-}*, effectuées par l'équipe de Hu, ont montré que les hépatocytes octoploïdes isolés de foie de souris âgées (18 mois) prolifèrent moins bien que les hépatocytes diploïdes et tétraploïdes issus de la même souris (Wang et al. 2014). En parallèle, des travaux de l'équipe de Grompe montrent que les hépatocytes diploïdes et les octoploïdes (8n) isolés de souris âgées de 3 à 6 mois, prolifèrent de façon similaire après transplantation dans le modèle de souris *Fah^{-/-}* (Duncan et al. 2010). Ces résultats montrent une corrélation entre l'augmentation du nombre d'hépatocytes polyploïdes et la sénescence tout en suggérant que l'augmentation de la polyploïdie avec le vieillissement, pourrait altérer les capacités régénératives du foie.

Par ailleurs, l'existence d'une ploïdie réverse définie par la genèse d'hépatocytes de ploïdie réduite à partir d'un hépatocyte de ploïdie plus élevée (4n, 8n ou plus) durant la prolifération a été rapportée par l'équipe de Grompe (Duncan et al. 2010). La ploïdie réverse serait liée à la mise en place d'une mitose multipolaire contrairement au fuseau bipolaire classique permettant l'obtention de deux cellules filles à partir d'une cellule mère unique. Les auteurs décrivent la ploïdie réverse comme un moyen d'adaptation des hépatocytes à leur environnement et cela augmenterait également la diversité génétique des hépatocytes. Ces observations ont été renforcées par les travaux de l'équipe de Hu, qui montrent que les hépatocytes isolés de souris âgées de 18 mois subissent un « Rajeunissement » après transplantation dans des souris *Fah^{-/-}* (Wang et al. 2014). En effet, l'analyse par cytométrie en flux des hépatocytes isolés de souris de 18 mois a révélé que le ratio d'hépatocytes di/tétra et octoploïdes a diminué après 10 semaines de transplantation dans des souris *Fah^{-/-}* et est devenu similaire à celui des hépatocytes de souris de 2 mois. Malgré une capacité proliférative amoindrie, les hépatocytes octoploïdes issus de souris de 18 mois seraient capables de repeupler le foie de souris *Fah^{-/-}* jeunes au bout de 10 semaines. L'analyse de repeuplement avec des hépatocytes octoploïdes a révélé que ces derniers génèrent des cellules filles de ploïdie plus réduite (2n et 4n) suite à des mitoses tri ou multipolaires. Plus encore, les expériences de repeuplement successive (transplantation de souris *Fah^{-/-}* avec des hépatocytes isolés de souris *Fah^{-/-}* préalablement repeuplées par des hépatocytes provenant de souris âgées, ceci jusqu'à 12 fois) ont montré que les hépatocytes polyploïdes sénescents subissent un « Rajeunissement » caractérisé par une augmentation de

leur capacité proliférative, une diminution de l'expression de marqueurs de sénescence et une ploïdie plus réduite (Wang et al. 2014).

4- Rôle et fonction biologiques de la polyploïdisation du foie

Bien que, la signification biologique de la polyploïdisation du foie demeure mal définie, un certain nombre d'hypothèses a été rapporté. L'une des hypothèses les plus répandues, stipule que la polyploïdie hépatique est associée à la maturation et à la différenciation terminale des hépatocytes (Schmucker 1990 , Gerlyng et al. 1993 , Gupta 2000 , Gandillet et al. 2003 , Asahina et al. 2006). Compte-tenu de l'architecture du foie, de nombreuses études ont rapporté que les hépatocytes diploïdes sont localisés dans la zone périportale alors que la zone périveineuse renferme des hépatocytes plus matures et de ploïdie plus élevée (Schmucker 1990 , Gerlyng et al. 1993 , Asahina et al. 2006). Cette hypothèse a cependant été remise en cause par une étude de l'équipe de Desdouets, qui stipule que les hépatocytes diploïdes et les polyploïdes sont répartis de façon aléatoire dans le lobule hépatique (Margall-Ducos et al. 2007). Cela indique que les hépatocytes polyploïdes ne reflètent pas systématiquement le niveau de différenciation terminale du foie d'autant plus qu'une étude de l'équipe de De Bruin a montré que les souris déficientes en E2F8, facteur de transcription nécessaire à la polyploïdisation, présentent un foie essentiellement diploïde et ont une capacité régénérative similaire à celle des souris sauvages ayant un foie polyploïde (Pandit et al. 2012). De plus, les études de prolifération et de repeuplement effectuées dans le modèle *Fah^{-/-}* par l'équipe de Grompe montrent, comme évoqué ci-dessus, que les hépatocytes polyploïdes d'individus jeunes ont une capacité proliférative similaire à celle des hépatocytes diploïdes (Duncan et al. 2010). Ces résultats indiquent donc que la polyploïdisation dans un foie jeune n'est pas associée à la différenciation terminale et n'a aucun impact évident sur la prolifération dans un contexte physiologique. Cependant, dans un foie vieillissant ou malade, une association entre la sénescence et la polyploïdisation apparaît. En effet, comme rapporté par l'équipe de Hu, l'augmentation de la polyploïdie chez les souris âgées corrèle avec une capacité proliférative amoindrie et une augmentation de l'expression de marqueurs de sénescence. Des études visant à définir les capacités prolifératives des différents contingents cellulaires polyploïdes issus de foies malades, par exemple les foies NAFLD, sont probablement en cours d'exploration et permettront de mieux définir le rôle de la polyploïdie dans un contexte pathologique.

La 2^{ème} hypothèse rapportée, est que la polyploïdie permettrait au foie d'améliorer ses fonctions (synthèse/sécrétion, métabolisme et détoxification) par l'expression doublée ou quadruplée de certains gènes ou protéines impliqués par exemple, dans le métabolisme. Cependant, la comparaison du profil d'expression génique des hépatocytes di/tétra et octoploïdes par des analyses micro-arrays, a montré que seulement 50 gènes candidats provenant d'une large gamme de processus biologiques différents étaient exprimés différemment (Lu et al. 2007). Ainsi, l'hypothèse selon laquelle, la polyploidisation du foie augmente ou non, la fonction des hépatocytes demeure discutable. Cependant, par une approche de « Comparative genome-scale », une étude récente a démontré que la polyploïdie augmente les fonctions spécifiques des tissus. Les gènes activés par la polyploïdie sont présents dans toutes les fonctions essentielles du foie, comme le métabolisme de l'azote, la synthèse des protéines du sang, la maintenance de l'état rédox, le métabolisme des xénobiotiques et l'immunité. De plus, d'après cette étude, un foie polyploïde a tendance à augmenter la production d'énergie anaérobie et à obtenir de l'ATP à partir des glucides plutôt que des acides gras suggérant que la polyploïdie est associée à une économie d'énergie (Anatskaya et al. 2007 , Anatskaya et al. 2010).

Enfin, la 3^{ème} hypothèse, est que la polyploïdie confère aux hépatocytes, une protection contre le stress oxydatif et les dommages génotoxiques. L'acquisition de multiples jeux de chromosomes pourrait compenser les mutations inactivatrices de gènes causées par des agents endommageant l'ADN. Par exemple, les lésions tumorales précoces dans le foie sont caractérisées par l'augmentation des cellules diploïdes, moins protégées des mutations que les cellules hépatiques polyploïdes (Pandit et al. 2013). En particulier, les études de comparaison génomique entre des hépatocytes diploïdes et polyploïdes, indiquent que la polyploïdie induit l'expression de gènes dirigés contre des agents pathogènes, des lésions à l'ADN et le stress oxydatif, et inhibe les gènes favorisant l'apoptose (Anatskaya et al. 2007 , Anatskaya et al. 2010). De plus, la polyploïdisation progressive observée au cours du vieillissement du foie, lui permettrait une adaptation à la dégénérescence cellulaire liée au vieillissement ou serait peut-être une réponse protectrice contre l'accumulation d'ADN endommagé. Dans un contexte pathologique, la polyploïdisation peut être un mécanisme utilisé par le foie pour essayer de compenser la perte de sa masse suite à une lésion hépatique.

5- Polyploïdie pathologique et atteintes hépatiques

Les hépatocytes différenciés conservent une forte capacité de prolifération. Lors d'une lésion hépatique induite par une hépatectomie partielle, une toxine, ou un médicament, les hépatocytes quiescents réentrent dans le cycle cellulaire et contribuent à la réparation de la lésion. Ainsi, différents travaux ont rapporté que la polyplôïdie hépatique peut également être modifiée par une surcharge métabolique, des dommages à l'ADN et des lésions induites par des agents chimiques. Par exemple, il a été rapporté que chez le rat LEC (« Long-evans cinnamon »), un modèle animal pour la maladie de Wilson, ayant une surcharge en cuivre et en fer dans le foie, les hépatocytes ont une polyplôïdie augmentée avec un retard de progression en mitose (Yamada et al. 1998). Récemment, l'équipe de Desdouets a rapporté que la maladie du foie gras (NAFLD ou « Nonalcoholic fatty liver disease ») est associée à une augmentation des hépatocytes hautement polyplôïdes dans le parenchyme hépatique (Gentric et al. 2015). En effet, l'analyse du foie de souris *ob/ob* ou sauvages soumises à un régime MCD (« Methionine-choline-deficient diet ») ou HFD (« High-fat diet ») a révélé une diminution des hépatocytes binucléés en faveur des mononucléés et une augmentation des contingents cellulaires hyperpolyplôïdes associée à une perte de la diploïdie hépatique. De façon intéressante, les auteurs ont observé un phénotype similaire dans le foie de patients ayant développé une stéatohépatite non alcoolique. Des hépatocytes de souris NAFLD *ex vivo*, progressent de la phase G1 à la phase S mais présentent un retard de sortie de la phase S et s'accumulent ou s'arrêtent en G2 suggérant que les hépatocytes hautement polyplôïdes proviennent principalement d'événements d'endoréplication. De plus, les hépatocytes NAFLD en phases S et G2 présentent un niveau élevé de stress oxydatif avec une forte phosphorylation d'ATR (« Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein »), un indicateur de la réponse aux dommages à l'ADN, et des marqueurs d'arrêt du cycle cellulaire (p21 augmentée et p53 phosphorylée). De plus, une augmentation importante de la polyplôïdie est observée suite à l'exposition aux radiations ou au stress oxydatif (Gorla et al. 2001). Ces observations indiquent que la polyplôïdisation pathologique du foie définie par une augmentation de la ploïdie nucléaire, serait régulée par les voies ATR/p53/p21 activées par le stress oxydatif (Gentric et al. 2015, Gentric et al. 2015).

Comme exposé précédemment, des pathogènes hépatotropes comme le *plasmodium*, les virus des hépatites B (VHB) et C (VHC) peuvent induire une polyplôïdie aberrante du foie. Par exemple, une étude a rapporté que le *Plasmodium*, l'agent de la malaria, infecte et se développe préférentiellement dans des hépatocytes de ploïdie élevée (Austin et al. 2014). La protéine Core

du VHC induirait l'augmentation du nombre d'hépatocytes tétraploïdes $4n$ par une inhibition des points de contrôle de la mitose (Machida et al. 2009). Quant au VHB, il induirait une augmentation de la polyploïdie par une amplification des centrosomes (Faivre et al. 2002). Les auteurs présentent l'augmentation de la ploïdie hépatique induite par le VHC et le VHB comme l'un des mécanismes utilisés par ces virus pour induire la transformation cellulaire (Faivre et al. 2002, Machida et al. 2009). De plus, l'équipe de Desdouets a rapporté il y a quelques années, une corrélation entre la sévérité des hépatites chroniques B et C et l'augmentation de la polyploïdie (Toyoda et al. 2005).

Au vu de ces données, comment peut-on expliquer, qu'une polyploïdie globale plus faible est observée dans le CHC par rapport au foie normal (Schwarze et al. 1991, Anti et al. 1994)? En effet, dans les modèles CHC induits par le DEN (« Diéthyl-nitrosamine ») ou le 2-AAF (« 2-acetyl-aminofluorene ») et dans les CHC humains, la fréquence des hépatocytes diploïdes mononucléés est augmentée avec une diminution des contingents cellulaires de ploïdie plus élevée (Schwarze et al. 1991, Anti et al. 1994). La réduction de ploïdie observée dans le CHC indique une corrélation inverse entre la prolifération et la ploïdie, puisqu'il a été rapporté que les hépatocytes de CHC prolifèrent comme des cellules diploïdes (Celton-Morizur et al. 2010).

Quels peuvent-être alors les mécanismes responsables du retour des hépatocytes hautement polyploïdes observés dans les étapes pré-cancéreuses à une prédominance d'hépatocytes diploïdes dans le CHC ?

L'une des hypothèses rapportées, est que ces contingents cellulaires de ploïdie élevée induits dans les étapes pré-cancéreuses par une polyploïdisation pathologique, subissent des mitoses multipolaires suite à la dérégulation des centrosomes (Ganem et al. 2009) générant ainsi des hépatocytes de ploïdie plus réduite dans le CHC. De façon intéressante, une amplification des centrosomes a été rapportée dans le CHC et favoriserait des erreurs de ségrégation chromosomique donc de l'aneuploïdie (Nigg 2002, Nakajima et al. 2004, Vitre et al. 2012).

De plus, la régulation par miR-122 de la ploïdie observée dans le CHC peut être envisagée. En effet, le développement du CHC s'accompagne d'une diminution de l'expression de miR-122. Comme évoqué précédemment, en plus de son rôle de suppresseur de tumeurs, miR-122 est considéré comme indispensable et suffisant à la polyploïdie hépatique (He et al. 2015, Simerzin et al. 2016). Ces observations indiquent la diminution de la ploïdie dans le CHC pourrait être liée à l'inhibition de l'expression de miR-122. D'autres facteurs comme la Survivine pourraient également être impliqués dans le profil de ploïdie observé dans le CHC. Une surexpression de

la Survivine a été décrite dans les CHC humains et une déficience en Survivine induit une polyplôidie et un arrêt du cycle cellulaire dans des cellules de CHC (Dai et al. 2012).



BUT DU TRAVAIL



BUT DU TRAVAIL

Malgré les avancées importantes en termes de stratégies vaccinales et thérapeutiques, l'infection chronique par le VHB reste un problème majeur de santé publique. Comme présenté dans cette introduction, la protéine HBx du VHB, joue un rôle important dans la carcinogenèse hépatique. Les données de la littérature concernant la protéine HBx, sont vastes et controversées pour certains de ces effets. Ainsi, mieux comprendre et déterminer les mécanismes par lesquels, HBx participe à la modulation du métabolisme hépatique et au développement du CHC, demeurent d'actualité.

Depuis quelques années, notre équipe s'intéresse à l'impact de l'expression des protéines HBx (formes complètes ou tronquées) sur la régulation de la prolifération physiologique et pathologique des hépatocytes. Par une approche *in vitro*, les travaux antérieurs de l'équipe ont montré que contrairement aux protéines FL-HBx (forme complète retrouvée dans la région non tumorale), les protéines Ct-HBx (forme tronquée en C-terminale retrouvée dans la région tumorale), avaient perdu la capacité de transactiver certains gènes cellulaires et d'inhiber la prolifération cellulaire (Sirma et al. 1999, Tu et al. 2001). Dans ce contexte, l'équipe a généré des souris transgéniques pour des séquences HBx isolées d'un tissu hépatique soit tumoral (Ct-HBx) soit non tumoral (FL-HBx) d'un même patient. Dans ce modèle de souris transgéniques, l'expression de chacune des formes d'HBx est sous le contrôle de son propre promoteur. Ainsi, l'équipe a pu montrer que l'expression de la protéine FL-HBx, et non la protéine Ct-HBx, est responsable d'un retard de la régénération hépatique (Quetier et al. 2013). Par ailleurs, *in vitro*, au contraire des protéines FL-HBx, les protéines Ct-HBx potentialiseraient la capacité de transformation des oncogènes Ras et Myc (Tu et al. 2001). Ces observations ont été également confirmées *in vivo* dans le modèle de CHC induit par le DEN (Quetier et al. 2015). L'ensemble de ces travaux aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* ont abouti à la caractérisation de nouveaux effets biologiques qui différencient les protéines FL-HBx et Ct-HBx du VHB. J'ai intégré l'équipe en tant qu'ingénieur d'étude et participé à la fin des deux premiers projets *in vivo* sur les deux formes de la protéine HBx.

Bien que, le rôle de la protéine FL-HBx en tant que cofacteur de la carcinogenèse ait été admis pas tous, beaucoup de controverses demeurent cependant quant à ces effets sur l'apoptose, la régulation du cycle cellulaire et les conséquences associées.

L'une des caractéristiques d'un cycle de division cellulaire dérégulé est la polyploïdie (physiologique ou pathologique). Comme évoqué ci-dessus, une polyploïdie pathologique a été rapportée chez des patients ayant une hépatite chronique B ou CHC lié au VHB (Gramantieri et al. 1996, Toyoda et al. 2005). De façon intéressante, la protéine FL-HBx induit des amplifications de centrosomes conduisant à une mitose défective et à de l'aneuploïdie dans des cellules NHF-hTERT (« hTERT-immortalized normal human fibroblast ») (Forgues et al. 2003). De plus, l'induction d'une polyploïdie pathologique *in vitro*, a été rapportée par l'équipe d'Andrisani, comme l'un des mécanismes utilisé par l'HBx dans la transformation des hépatocytes (Studach et al. 2009).

Compte-tenu de ces données *in vitro* rapportées dans la littérature, un point primordial a été leur validation *in vivo*. Ainsi, afin de mieux caractériser les effets biologiques de la protéine FL-HBx dans des contextes de prolifération physiologique et pathologique du foie et leur contribution à la carcinogenèse hépatique, mon projet de recherche a eu pour objectif, grâce à une approche *in vivo*, de déterminer l'impact de la protéine FL-HBx sur la polyploïdisation des hépatocytes :

- Au cours du développement du foie après la naissance (prolifération physiologique) et le mécanisme associé.
- Au cours de la maladie hépatique (fibrose et étapes précoces du CHC) et ses conséquences éventuelles dans la sévérité et le développement du CHC.



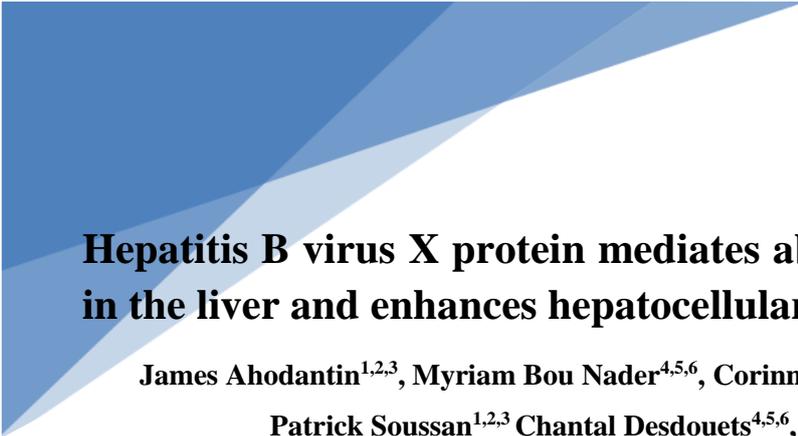
RESULTATS





RESULTATS (A)





Hepatitis B virus X protein mediates aberrant polyploidization in the liver and enhances hepatocellular carcinoma initiation.

**James Ahodantin^{1,2,3}, Myriam Bou Nader^{4,5,6}, Corinne Cordier^{7,8}, Jérôme Mégret^{7,8},
Patrick Soussan^{1,2,3}, Chantal Desdouets^{4,5,6}, Dina Kremsdorf^{1,2,3}.**

1. INSERM U1135 CIMI-PARIS, TEAM «PERSISTENT VIRAL INFECTIONS», PARIS, FRANCE.
2. UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE, PARIS, FRANCE.
3. CNRS, ERL 8255, PARIS, FRANCE
4. INSERM, U1016, INSTITUT COCHIN, PARIS, FRANCE.
5. CNRS, UMR8104, PARIS, FRANCE.
6. UNIVERSITE PARIS DESCARTES, SORBONNE PARIS CITE; PARIS, FRANCE.
7. CYTOMETRY CORE FACILITY, INSERM US24/CNRS UMS 3633-SFR NECKER, PARIS, FRANCE.
8. FACULTE DE MEDECINE, PARIS DESCARTES, PARIS, FRANCE.

Soumis pour publication à Journal of Hepatology.

I. Contexte et but de l'étude

La protéine virale FL-HBx joue un rôle crucial aussi bien dans la réplication du VHB que dans l'induction d'instabilité génétique, une force motrice dans le développement du CHC. Cependant, comment la protéine FL-HBx favorise l'instabilité génétique au cours de la prolifération hépatique demeure encore flou.

Au cours du développement postnatal du foie où a lieu une prolifération physiologique et transitoire du foie, les hépatocytes diploïdes à la naissance subissent une polyploïdisation caractérisée par un changement du nombre de jeu de chromosome et une augmentation du contenu en ADN. Cet événement physiologique qui accompagne le développement postnatal du foie, est caractérisé par des cytokinèses incomplètes conduisant à une apparition progressive et croissante du nombre d'hépatocytes binucléés qui par la suite génèrent des hépatocytes mononucléés avec des contenus en ADN $2N$, $4N$ et $\geq 8N$. La polyploïdisation se produit à partir de la 2^{ème} semaine après la naissance et touche environ 80% des hépatocytes adultes chez la souris et 40% chez l'homme. Elle participerait à la régulation de la taille et de l'organisation du foie mais aussi permettrait au foie de s'adapter aux conditions de stress.

En revanche, la génération d'hépatocytes mononucléés polyploïdes ($4N$ et $\geq 8N$) directement à partir des hépatocytes diploïdes ($2N$) au détriment des hépatocytes binucléés est considérée comme une polyploïdisation pathologique. Cette dernière serait liée à des mitoses abortives conduisant à des événements d'endoréplication et à de l'instabilité génétique. Cette polyploïdisation pathologique du foie a été rapportée dans la NASH/NAFLD mais également dans la fibrose et le CHC induite par le VHB.

La 1^{ère} question est de savoir si l'expression de la protéine FL-HBx pourrait influencer la polyploïdisation physiologique des hépatocytes au cours du développement postnatal du foie. Ensuite de déterminer si l'augmentation de l'instabilité génétique par la protéine FL-HBx pourrait être liée à l'induction éventuelle d'une polyploïdisation pathologique des hépatocytes et l'éventuelle contribution de ce mécanisme dans l'initiation du CHC.

Pour notre étude, des souris transgéniques (Tg) FL-HBx dont l'expression est sous le contrôle du promoteur viral, ont été utilisées. Dans notre modèle, ces animaux ne présentent pas de développement spontané de tumeurs. L'effet de l'expression de la protéine FL-HBx sur la polyploïdisation des hépatocytes a été analysé, dans un 1^{er} temps, au cours du développement postnatal du foie. La polyploïdisation des hépatocytes dans un contexte d'infection VHB a été ensuite analysée dans le modèle de souris uPA. Enfin, le modèle de CHC induit par le diéthyl-

nitrosamine (DEN) a été utilisé afin de déterminer d'éventuels changements dans la polyploïdisation des hépatocytes lors des étapes d'initiation et promotion du CHC et leur contribution dans le développement de tumeurs hépatiques.

II. Protéine FL-HBx : impact sur la polyploïdisation physiologique et le métabolisme des hépatocytes

L'analyse de la polyploïdisation des hépatocytes au cours du développement postnatal du foie, a montré dans les souris Tg FL-HBx, un retard de l'établissement de la binucléation des hépatocytes de J13 à J25 et une augmentation précoce du pourcentage d'hépatocytes mononucléés polyploïdes ($\geq 4n$) à J15 et J17. Cependant, à 3 mois, les souris Tg FL-HBx présentent des pourcentages d'hépatocytes binucléés et d'hépatocytes mononucléés (2N, 4N et $\geq 8N$) similaires à ceux des souris sauvages. Au vu de ces résultats, l'expression de gènes impliqués dans la différenciation et la maturation des hépatocytes, a été analysée. De façon intéressante, bien que le niveau et la localisation de l'expression de la glutamine synthétase soit similaire entre les deux groupes de souris, une baisse de la transcription de C/EBP- α et de PepCK, et une augmentation des transcrits AFP ont été détectées dans les souris Tg FL-HBx à J17 suggérant un retard de maturation des hépatocytes exprimant la protéine FL-HBx.

L'évaluation de la polyploïdie 3 mois après l'infection par le VHB a révélé une diminution du pourcentage d'hépatocytes binucléés humains dans les animaux infectés par rapport aux contrôles. De plus, une prédominance d'hépatocytes hautement polyploïdes ($\geq 8N$) a été observée dans les clusters humains des souris infectées indiquant l'induction d'une polyploïdisation anormale des hépatocytes au cours d'une infection VHB.

Comme l'altération de la polyploïdie est générée par des défauts de la réplication de l'ADN, nous avons étudié le cycle de division cellulaire des hépatocytes. Cet étude a révélé une diminution continue de l'expression de Ki67 (marqueur de cellules en phases G1, S, G2 et M) de J13 à J25 dans les souris sauvages tandis que les souris Tg FL-HBx présentent encore à J17 et à J20, un nombre élevé de noyaux Ki67⁺ indiquant une dérégulation du cycle cellulaire des hépatocytes chez les souris Tg FL-HBx. Cette observation a été confirmée par un test d'incorporation du BrdU qui a montré que contrairement aux animaux contrôles, les souris Tg FL-HBx présentent encore une augmentation du nombre d'hépatocytes BrdU⁺ à J17 et J20 ; ceci associé à une transcription accrue des cyclines E1, A2 et de Cdc6 suggérant une

accumulation des hépatocytes en phase S du cycle cellulaire dans ces animaux. L'étude de la transition G1/S du cycle cellulaire a montré l'augmentation de l'expression de la cycline D1 et de Cdk4 de J15 à J20 dans les souris Tg FL-HBx comparées aux contrôles indiquant un raccourcissement de la phase G1 chez les souris Tg FL-HBx ceci pouvant expliquer l'entrée rapide en phase S des hépatocytes exprimant la protéine FL-HBx. L'analyse de la transition G2/M, quand à elle, a révélé une phosphorylation plus élevée de l'histone H3 de J15 à J20 dans les souris Tg FL-HBx comparées aux contrôles indiquant une accumulation d'hépatocytes dans les phases G2 et M en présence de la protéine FL-HBx. Cependant, le pourcentage d'hépatocytes en mitose est significativement plus faible de J15 à J20 dans les souris Tg FL-HBx par rapport aux contrôles. De plus, par western blot, une expression similaire de la cycline B1 est observée de J15 à J20 dans les deux groupes de souris tandis qu'une phosphorylation plus élevée et persistente de la Tyr15 est détectée uniquement dans les souris Tg FL-HBx indiquant un arrêt en G2/M et une accumulation en G2 des hépatocytes exprimant la protéine FL-HBx. Ceci peut expliquer le faible index mitotique observé dans ces animaux.

Au cours de la transition G2/M, l'ADN endommagé est réparé ou les cellules sont dirigées vers l'apoptose. L'échappement à l'apoptose par induction de mitoses abortives, est responsable de la propagation de dommages à l'ADN. Par western blot, une phosphorylation plus élevée et persistente de J15 à J20 de l'histone H2AX, marqueur de dommages à l'ADN, et une diminution à J20 de l'expression des protéines Mre11 et Rad51 impliquées dans la réparation de l'ADN, ont été détectées dans les souris Tg FL-HBx. De plus, une augmentation de la transcription de PLK1, impliquée dans l'atténuation des points de contrôle en G2/M et de la phosphorylation de p38 à J15 et d'ERK à J15 et J17 a été observée dans les souris Tg FL-HBx. De façon intéressante, une étude *in vitro*, a rapporté que la protéine HBx favorise la propagation de dommages à l'ADN en induisant une augmentation transitoire de la ploïdie nucléaire des hépatocytes par les voies PLK1 et p38 Mapk (Studach et al. 2010).

L'étape suivante a été de valider ces observations en inhibant la voie p38 avec le SB203580 dans les souris Tg FL-HBx. Bien que des souris Tg FL-HBx traitées au SB203580 ou au DMSO présentent une expression de Ki67 et une incorporation de BrdU similaires, l'inhibition de p38 induit une augmentation du pourcentage de cellules mitotiques et une diminution de la transcription de PLK1. De plus, une diminution de la phosphorylation d'ERK et une augmentation de Mre11 sont observées dans les souris Tg FL-HBx traitées au SB203580 par rapport à celles traitées au DMSO. Ceci est associé à une restauration partielle du pourcentage

d'hépatocytes binucléés, une augmentation des hépatocytes diploïdes (2N) et une diminution des hépatocytes polyploïdes ($\geq 4N$).

III. Protéine FL-HBx et polyploïdie : impact sur l'initiation et le développement du CHC

L'étape suivante de notre étude a été de déterminer si l'expression de la protéine FL-HBx pourrait promouvoir la polyploïdisation pathologique des hépatocytes induite le DEN et si la protéine FL-HBx utiliserait ce mécanisme pour potentialiser le développement du CHC.

Pour cela, le CHC a été initié dans les deux groupes de souris avec une dose unique de DEN. L'administration de DEN induit une augmentation de la phosphorylation de l'histone H2AX, marqueurs de dommages à l'ADN, dès 4 heures dans les 2 groupes de souris avec un niveau plus élevé dans les souris Tg FL-HBx. Ceci est corrélé à une inhibition de la phosphorylation de ChK1 et de l'expression de Mre11 et Rad51 dans ces animaux. De plus, les souris Tg FL-HBx traitées présentent moins de caspase 3 clivée comparées aux contrôles 4 heures après le traitement. De façon intéressante, l'induction plus élevée de dommages à l'ADN et l'inhibition de l'apoptose dans les souris Tg FL-HBx traitées, ont été confirmées respectivement par une augmentation significative de la transcription de Gadd45- α et de Bcl2. Enfin, 4 heures après l'initiation, comparées aux contrôles, les souris Tg FL-HBx présentent une augmentation de l'expression d'IL-6 et de TGF- β décrits comme participant à la promotion du CHC.

Au vu de ces résultats, la polyploïdisation des hépatocytes a été analysée 48 heures et 75 jours après l'initiation du CHC. De façon surprenante, une forte inhibition de la binucléation des hépatocytes a été observée dans les souris sauvages 48 heures après l'initiation tandis que dans les souris Tg FL-HBx où la binucléation est déjà inhibée, une inhibition additionnelle n'a pas été détectée après traitement suggérant que la protéine FL-HBx et le DEN utiliseraient des voies similaires dans l'inhibition de la binucléation. Cependant, 75 jours après l'initiation, les pourcentages de binucléation deviennent similaires entre les deux groupes de souris traitées. En revanche, l'analyse du contenu en ADN des hépatocytes 48 heures et 75 jours après initiation, a montré dans les souris Tg FL-HBx, une induction plus élevée et persistente d'hépatocytes polyploïdes ($\geq 4N$) corrélée à une augmentation de la phosphorylation de p38 Mapk et de la transcription de la cycline A2 et PLK1.

De façon intéressante, 75 jours après l'initiation du CHC, les deux groupes de souris présentent une augmentation significative de l'expression de Ly6D et de GpC3, marqueurs de cellules progénitrices tumorales, avec une transcription plus élevée de Ly6D dans les souris Tg FL-HBx. De plus, une induction significative de l'expression d'AFP a été observée uniquement dans les souris Tg FL-HBx traités.

IV. Conclusion

Nos résultats montrent pour la 1^{ère} fois dans un contexte de prolifération physiologique du foie, une dérégulation des transitions G1/S et G2/M du cycle cellulaire des hépatocytes en présence de la protéine FL-HBx. Ceci ayant comme conséquences une augmentation d'hépatocytes polyplœides ($\geq 4N$) au détriment des hépatocytes binucléés et une propagation de dommages à l'ADN dans le foie. De plus, cette polyplœidisation considérée comme pathologique a été retrouvée dans un contexte d'infection VHB. Nous avons ensuite démontré dans les souris Tg FL-HBx que ce mécanisme est régulé par la surexpression de PLK1 via les voies de signalisation p38/ERK Mapk. De plus, nous rapportons que la protéine FL-HBx peut potentialiser la polyplœidisation pathologique et l'inflammation induites par le DEN conduisant à l'amélioration de l'initiation du CHC.

Hepatitis B virus X protein mediates aberrant polyploidization in the liver and enhances hepatocellular carcinoma initiation

James Ahodantin^{1,2,3}, Myriam Bou Nader^{4,5,6}, Corinne Cordier^{7,8}, Jérôme Mégret^{7,8}, Patrick Soussan^{1,2,3}, Chantal Desdouets^{4,5,6}, Dina Kremsdorf^{1,2,3}.

1. Inserm U1135 CIMI-Paris, Team «Persistent Viral Infections», Paris, France.
2. Université Pierre et Marie Curie, Paris, France.
3. CNRS, ERL 8255, Paris, France
4. Inserm, U1016, Institut Cochin, Paris, France.
5. CNRS, UMR8104, Paris, France.
6. Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité; Paris, France.
7. Cytometry Core Facility, Inserm US24/CNRS UMS 3633-SFR Necker, Paris, France.
8. Faculté de Médecine, Paris Descartes, Paris, France.

Keywords: Hepatitis B virus X, Polyploidization, Liver proliferation, HCC.

Corresponding author: Dina Kremsdorf, INSERM U1135, CIMI Paris, 91 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France. Phone: +331-4077-9898. E-mail: dina.kremsdorf@inserm.fr

Electronic word count: 6050 (with acknowledgements, 46 words).

Number of figures and tables: 8 figures

Potential conflict of interest : Nothing to report

Financial support : This work was supported by grants from the *Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les Hépatites Virales* (ANRS) (AO 2014-1 16032), *Ligue Contre le Cancer* (2016, RS16/75-7 and 2017 RS17/75-23), *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* (Inserm) and *Université Pierre et Marie Curie* (UPMC). J.A. was supported by an ANRS doctoral grant.

Author Contributions: Study concept and design: D.K., J.A., C.D. Acquisition of data, analysis and interpretation of data: J.A, M.B N., C.C., P.S., C.D., D.K. Drafting of the manuscript: D.K, J.A., C.D. Obtained funding: D.K.

ABSTRACT

1
2
3 **Background & Aims:** Hepatitis B virus X protein (HBx) is involved in the
4 development of hepatocellular carcinoma (HCC). However, its role in liver
5 proliferation and a loss of genomic integrity remains unclear. We investigated the
6 impact of HBx production on hepatocyte polyploidization during liver proliferation and
7 its contribution to HCC development.
8
9

10 **Methods:** Mice transgenic for the full-length HBx (FL-HBx) were used to evaluate
11 hepatocytes polyploidization, during normal liver proliferation and HCC initiation after
12 diethyl nitrosamine treatment.
13
14

15 **Results:** During postnatal liver development, FL-HBx expression delayed the
16 establishment of liver binucleation and triggered an early production of polyploidy
17 nuclei ($\geq 4n$). These features were associated with aberrant G1/S and G2/M
18 transitions and the propagation of DNA damage. Furthermore, HBV infection, in a
19 mouse model of human hepatocytes proliferation, was associated with changes in
20 hepatocytes polyploidy. During HCC initiation, FL-HBx impaired ChK1 activation and
21 Mre11 and Rad51 expression, inhibited apoptosis and upregulated IL-6 transcription.
22 These features were associated with an enhancement of nuclear ploidy and an
23 accumulation of DNA damage in animals transgenic for FL-HBx. Seventy-five days
24 after HCC initiation, FL-HBx animals displayed marked alterations to the cell cycle
25 associated with larger numbers of tetraploid nuclei and stronger expression of HCC
26 progenitor cell markers. Furthermore, p38/ERK activation and Plk1 upregulation by
27 FL-HBx were involved in abnormal polyploidization during postnatal liver
28 development and hepatocytes transformation.
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54

55 **Conclusions:** Our results show that FL-HBx promotes DNA damage propagation,
56 thereby inducing aberrant hepatocyte polyploidy and favoring HCC initiation.
57
58
59
60
61
62
63
64
65

INTRODUCTION

1
2
3
4 Polyploidy is a state in which cells possess more than two sets of homologous
5 chromosomes, and is a characteristic feature of mammalian hepatocytes.⁽¹⁾ Up to
6 90% of adult hepatocytes in mice⁽²⁾ and about 40% in humans are polyploid.⁽³⁾
7
8 Hepatocyte polyploidy are defined on the basis of the number of nuclei per cell
9 (cellular ploidy) or the DNA content of each nucleus (nuclear ploidy). Hepatocyte
10 polyploidization is an age-dependent process. Almost all hepatocytes in young
11 animals are diploid, and the number of polyploid cells increases with age.^(4, 5)
12
13 Previous studies have shown that polyploid hepatocytes are generated in a stepwise
14 manner, in a process called physiological polyploidization. Around the time of
15 weaning, a subset of diploid hepatocytes undergo full karyokinesis with incomplete
16 cytokinesis, leading to the generation of binucleate tetraploid hepatocytes ($2 \times 2n$).^(6, 7)
17
18 If these hepatocytes re-enter the cell cycle, they either undergo cytokinesis,
19 generating tetraploid mononuclear hepatocytes ($4n$), or the process fails again,
20 leading to the production of an octoploid binuclear hepatocyte ($2 \times 4n$). The biological
21 properties of polyploidization during liver development are poorly understood, but this
22 process may help to generate genetic diversity by conferring specificity in the
23 metabolic processes of the cells involved in hepatocyte terminal differentiation.^(1, 8) In
24 addition to its role in physiological liver development, polyploidy has been reported to
25 act as a mechanism of stress-induced liver adaptation.^(9, 10) Interestingly, distinctive
26 hepatocyte ploidy profiles have been reported for patients with chronic hepatitis due
27 to hepatitis virus B or C infection, suggesting the involvement of different molecular
28 pathways in ploidy alterations in these two viral infections.⁽³⁾
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Chronic hepatitis B virus (HBV) infection is associated with hepatic lesions that may develop into hepatocellular carcinoma (HCC).⁽¹¹⁾ The onset of HCC is linked primarily to chronic inflammation due to the host immune response to infected liver cells (90% of HCCs develop in cirrhotic livers).⁽¹¹⁾ Recent studies have highlighted the importance of genetic instability in HBV-related HCC.⁽¹¹⁾ In particular, aneuploidy has been detected in the livers of patients with chronic HBV infection, predisposing these individuals to HCC.⁽¹²⁾ This may be triggered by integration of the viral genome into the host genome and the production of viral proteins.⁽¹¹⁾ The hepatitis B virus X protein (HBx) is essential for HBV replication and is thought to play a major role in HCC. The HBx protein has pleiotropic biological effects in intracellular signalling, transcriptional activation modulating the cell signaling pathways controlling cell cycle progression, responses to genotoxic stress and apoptosis, which may underlie its potential for cell transformation.⁽¹³⁾ HBx protein has been reported to stimulate cell cycle progression by accelerating checkpoint transition, or by abolishing the expression of miR-122, leading to the release from G1/S arrest.⁽¹⁴⁾ By contrast, other studies have reported that HBx protein may inhibit liver cell proliferation, by inducing expression of the cell cycle regulators p21 and p27 or blocking cells at the G1/S boundary.^(15, 16) In our recent studies of a mouse model, we obtained data suggesting that HBx may delay liver regeneration after partial hepatectomy.⁽¹⁷⁾ Many other studies have shed light on the potential role of HBx protein in deregulating the cellular DNA repair process. Indeed, it has been suggested that the HBx protein interacts physically with proteins involved in DNA repair⁽¹⁸⁻²⁰⁾ or disrupts nucleic acid metabolism.⁽²¹⁾ The HBx protein may also cause DNA damage in the host cell genome by inducing oxidative stress, leading to the production of reactive oxygen species, or by modulating the expression of oxidative stress indicators.^(22, 23) A deregulation of the DNA repair machinery and the induction of DNA damage by HBx

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

protein has been reported to be associated with delayed cell-cycle progression at the G2/M phase.^(22, 23) Alternatively, HBx protein may contribute to dysregulation of the mitotic checkpoint, possibly by increasing centrosome numbers.^(24, 25) The DNA re-replication induced by HBx protein has been linked to partial polyploidy.⁽²⁶⁾ Indeed, HBx protein has been reported to activate polo-like kinase 1 (Plk1), a factor crucial for entry into mitosis, in untransformed hepatocytes, thereby propagating DNA damage and generating partial polyploidy.⁽²⁷⁾

The large majority of data on HBx and cell cycle deregulation was obtained using in vitro models. We thus wanted investigated, in vivo, the effects of the full-length HBx (FL-HBx) on polyploidization during physiological liver proliferation and early stages of carcinogenesis. We found that, in vivo, FL-HBx promoted changes to hepatocyte polyploidy due to cell cycle deregulation by the accumulation of DNA damage and thus played a key role in cell transformation.

MATERIALS AND METHODS

Transgenic mice

FL-HBx transgenic mice, in which expression of the full-length HBx was under the control of viral regulatory elements, were obtained as previously described.⁽¹⁷⁾ All experiments were performed on male heterozygous transgenic mice and littermate controls. The generation of Alb-uPA^{+/+}/SCID mice has been described elsewhere.⁽²⁸⁾ The animals were kept in pathogen-free conditions and were treated in accordance with European Union regulations on animal care (Directive 86/609/EEC).

Animal experiments

For postnatal liver development studies, from days 13 to 90, mice were killed two hours after a single intraperitoneal BrdU (100 mg/Kg) injection on days 13 to 25. For accumulation assays, BrdU was injected into the mice twice daily from days 17 to 20. Newborn mice were treated with the p38 inhibitor SB203580 (5 mg/kg, InvivoGen) by intraperitoneal injection on days 13 and 15 and were killed on day 17. uPA^{+/+}/Scid/RAG/GammaC mice received intrasplenic injections of the same batch of human hepatocytes (BD Bioscience) and were infected with HBV as described elsewhere.⁽²⁸⁾ For the initiation of liver carcinogenesis, diethyl nitrosamine (DEN) (25 mg/kg) was injected intraperitoneally into 15-day-old mice.

For further details regarding the materials used, please refer to the Supplementary material.

RESULTS

Abnormal physiological polyploidization in livers of FL-HBx transgenic mice

We investigated whether FL-HBx expression modified the time course of hepatocyte polyploidization during postnatal liver development (Fig. 1). We first determined the distribution of mono- and binucleate hepatocytes, over a time course from 13 days to three months after birth. On day 13, the percentage of binucleate hepatocytes was <5% in both groups of mice. Consistent with previously published data for wild-type (WT) mice, hepatocyte binucleation rapidly increased to about 28% of the cells from days 15 to 25. By contrast, in FL-HBx transgenic mice, the percentage of binucleate cells remained unchanged (about 6%) on days 15 and 17, but began to increase on day 20 to reach about 25% by day 25 (Fig. 1B). At three months, the percentage of binucleate hepatocytes was about 27% in both groups of animals (Fig. 1C).

We then investigated nuclear ploidy. Throughout the time course of the study, predominantly diploid (2n) nuclei were observed (98% to 75%) (Fig. 1B and C). In FL-HBx transgenic mice, the hepatocyte population was enriched in cells with polyploid nuclei ($\geq 4n$) at days 15 (WT: $2.5 \pm 1.3\%$, FL-HBx: $4.2 \pm 1.4\%$) and 17 (WT: $2.2 \pm 0.9\%$, FL-HBx: $5.9 \pm 4.3\%$) (Fig. 1B). However, by days 20 and 25, the percentage of polyploidy nuclei ($\geq 4n$) was similar in the two groups (WT: $2.5 \pm 0.8\%$, FL-HBx: $2.8 \pm 1.0\%$ or WT: $9.1 \pm 2.5\%$, FL-HBx: $7.1 \pm 2.5\%$, respectively) (Fig. 1B). Similarly, at three months of age, about 20% of nuclei were tetraploid (4n) and about 2.5% were octoploid (8n) in both groups of mice (Fig. 1C). We then checked whether the deregulation of physiological polyploidy affected the terminal differentiation of hepatocytes. On postnatal day 17, despite the presence of similar levels of glutamine synthetase in the perivenous zone in both groups of mice (Fig. 1D), the FL-HBx transgenic mice had lower levels of transcription for C/EBP- α and PepCK, two

1 markers of hepatocyte differentiation and high levels of AFP transcripts, a
2 characteristic feature of immature hepatocytes (Fig. 1E). However, no differences in
3 transcription were observed at three months of age (data not shown). Our data for
4 postnatal liver development are consistent with a transient impairment of the
5 physiological polyploidization and maturation of hepatocytes in FL-HBx transgenic
6 mice.
7
8
9
10
11
12
13
14

15 ***Polyploidy profile in the livers of HBV-infected humanized uPA mice***

16
17 We then investigated whether, in a mouse model of liver proliferation, chronic HBV
18 infection altered the polyploidy of hepatocytes. We used the
19 uPA^{+/+}/Scid/RAG/GammaC mouse model with humanized liver, susceptible to HBV
20 infection. Experimental bias was avoided by studying mice transplanted with the
21 same batch of human hepatocytes, infected or not with HBV (Fig. 2A). Liver and
22 serum samples were obtained three months after infection, and transplantation rates
23 (human albumin levels) and viremia (HBV copies) were determined (Fig. 2B). Human
24 hepatocyte clusters were visualized by human cytokeratin 18 immunostaining (Fig.
25 2C). Interestingly, as we observed for FL-HBx transgenic mice, HBV-infected animals
26 had lower number of binucleate human hepatocytes (WT: 13.3±1.3%, FL-HBx:
27 9.2±1.2%) (Fig. 2D). Furthermore, in HBV-infected mice a higher proportion of ≥8n
28 human nuclei were recorded compared with the total of polyploid human nuclei (≥4n)
29 (Fig. 2D). These data illustrate the capacity of HBV to induce abnormal hepatocyte
30 polyploidy in a proliferative context.
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53

54 ***Aberrant G1/S and G2/M transitions in the hepatocytes of FL-HBx transgenic*** 55 ***mice*** 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65

1 We characterized the transient ploidy abnormalities in the liver of FL-HBx transgenic
2 mice, by analyzing hepatocyte proliferation (Figs. 3 and 4, Fig. S1A and B). As
3 expected, postnatal liver development was characterized by robust but transient
4 hepatocyte proliferation, as shown by the cell cycle markers Ki-67 and BrdU (Fig.
5 3B). Ki67 labeling decreased with age in WT mice, whereas the nuclei remained
6 strongly labeled for Ki67 at days 17 and 20 in FL-HBx transgenic mice. However,
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

We characterized the transient ploidy abnormalities in the liver of FL-HBx transgenic mice, by analyzing hepatocyte proliferation (Figs. 3 and 4, Fig. S1A and B). As expected, postnatal liver development was characterized by robust but transient hepatocyte proliferation, as shown by the cell cycle markers Ki-67 and BrdU (Fig. 3B). Ki67 labeling decreased with age in WT mice, whereas the nuclei remained strongly labeled for Ki67 at days 17 and 20 in FL-HBx transgenic mice. However, Ki67 staining was similar in the two groups by day 25. BrdU incorporation assays were performed to determine the proportion of hepatocytes in S-phase. On day 17, BrdU incorporation rates were higher in FL-HBx transgenic mice than in WT mice. An accumulation assay (days 17 to 20) confirmed the higher level of BrdU incorporation in FL-HBx transgenic mice (Fig. 3B). This accumulation of cells in S-phase was confirmed by the increase in cyclin A2 mRNA levels observed on days 17 and 20 in FL-HBx transgenic mice (Fig. 3C). Furthermore, on days 17 and 20, G1 deregulation was demonstrated by the higher levels of the cyclin D1 and Cdk4 proteins and of the cyclin E1 and Cdc6 mRNAs (Fig. 3C and D, Fig. S1A). FL-HBx expression thus induced a short G1 phase and an accumulation in S-phase in hepatocytes.

We hypothesized that the delayed binucleation of hepatocytes, with the early production of mononuclear polyploid hepatocytes, might be promoted by mitosis defects.⁽²⁹⁾ We thus investigated G2/M transition. Mitosis entry is triggered by activation of the CcnB1/Cdk1 complex, which is controlled by dephosphorylation of the tyrosine residue in position 15 of the Cdk1 protein.⁽³⁰⁾ Cyclin B1 levels were similar in the two groups of mice, but higher levels of phosphorylation of histone H3 (Ser 10) and of Cdk1 (Tyr 15) were observed in FL-HBx transgenic mice, from days 15 to 20 (Fig. 4A, Fig. S1B). The G2/M transition defect was confirmed by counting mitotic events in hepatocytes (Fig. 4B). From days 13 to 20, the proportion of mitotic cells increased from 30% to 46% in WT mice, whereas it remained stable (30% to

34%) in FL-HBx transgenic mice. By day 25, similar numbers of mitotic events were occurring in both groups. Thus, FL-HBx expression induces a transient G2/M arrest.

We investigated whether the G2/M arrest observed in FL-HBx transgenic mice was associated with HBx-induced DNA damage. We thus evaluated the induction of DNA damage by analyzing phosphorylated H2AX protein levels. On days 15, 17 and 20, the level of H2AX phosphorylation was higher in the livers of FL-HBx transgenic mice than in control mice (Fig. 4A, Fig. S1B). These higher levels of H2AX phosphorylation were associated, on day 20, with lower levels of two DNA repair protein, Mre11 and Rad51 (Fig. 4A).

Our results indicate that the delay in hepatocyte binucleation in the liver of FL-HBx transgenic mice was preceded by the transient production of mononuclear polyploid hepatocytes. These features were associated with the ability of FL-HBx to promote DNA damage, which was responsible for the slowing of G2/M progression. However, our data for cell cycle progression indicate that FL-HBx counteracts the G2/M cell cycle checkpoint, allowing DNA damage to spread.

Activation of the p38 and ERK MAPKs drives abnormal liver polyploidization in FL-HBx transgenic mice

The activation of p38 plays a role in hepatocyte growth arrest during liver development and low-level oxidative stress.^(31, 32) We investigated whether the abnormal hepatocytes polyploidization observed in FL-HBx transgenic mice was associated with p38 MAPK pathway modulation. We analyzed the phosphorylation of p38 and ERK from days 15 to 20 after birth. The p38 (day 15) and ERK (days 15 and 17) MAPKs were found to be more strongly activated in FL-HBx transgenic than in control mice (Fig. 4C, Fig. S1C). This stronger activation was associated with higher

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

levels of Plk1 transcripts (days 17 and 20) in FL-HBx transgenic mice, as previously reported in vitro^(27, 33) (Fig. 4D).

We investigated the role of p38 in hepatic polyploidy in FL-HBx transgenic mice further, by inhibiting p38 with SB203508 (Fig. 5A). Treated mice had slightly lower levels of Ki67 expression, no significant difference in liver cell proliferation was observed between DMSO- and SB203580-treated mice (Fig. 5B). However, SB203580 treatment restored the number of mitotic cells and decreased Plk1 transcription and ERK phosphorylation (Fig. 5C-E). It was also associated with higher levels of Mre11, a partial recovery of liver binucleation and smaller numbers of polyploidy nuclei ($\geq 4n$) in treated FL-HBx transgenic mice (Fig. 5E, F). Our data reveal how the modulation of p38 and ERK by the FL-HBx protein hijacks physiological hepatocytes polyploidization during liver development.

FL-HBx enhances HCC initiation by altering liver polyploidization

We previously showed that FL-HBx increases the development of DEN-induced HCC⁽³⁴⁾, suggesting that FL-HBx may enhance the early stages of HCC development. We investigated the effect of HBx on HCC initiation/promotion and the role of hepatocyte polyploidization in the development of liver cancer (Fig. 6A). Four hours after DEN treatment, the levels of transcription of genes involved in stress sensor activities (Gadd45- α), and protection against apoptosis (Bcl2) and inflammation (IL-6, TGF β ; and a trend for TNF- α) were higher in FL-HBx transgenic mice than in controls (Fig. 6B). DNA damage levels were also higher in FL-HBx transgenic mice, as shown by the levels of H2AX phosphorylation, an inhibition of expression for the DNA repair genes encoding Rad51 and Mre11 and cell cycle checkpoint 1(ChK1) inactivation (Fig. 6C, D). Furthermore, less cleaved caspase-3 was detected in FL-HBx transgenic mice four hours after DEN treatment (Fig. 6D).

1
2
3 Thus, during the early stages of carcinogenesis, in addition to deregulating pathways
4 involved in DNA repair or apoptosis in hepatocytes, the FL-HBx protein also
5 promotes initiated hepatocyte survival, thereby favoring HCC development.

6
7 We evaluated hepatocyte proliferation and polyploidization during HCC development
8 in both groups of mice. Forty-eight hours after DEN-induced HCC initiation, we
9 observed WT mice, a decrease in the number of binucleated hepatocytes (PBS:
10 12.8±2.6% vs. DEN: 4.5±1.8%) and an increase in the number of polyploidy nuclei
11 (≥4n) (PBS: 2.2±0.9% vs DEN: 5±1.2%) (Fig. 7A). By contrast, in FL-HBx transgenic
12 mice, treatment did not further inhibit binucleation (PBS: 6.0±2.1% vs. DEN:
13 5.1±2.7%). However, the percentage of polyploid nuclei (≥4n) was higher in treated
14 FL-HBx transgenic than in treated control mice (WT: 5±1.2% vs. FL-HBx: 7.9±1.5%)
15 (Fig. 7A). Concerning liver proliferation, DEN treatment did not modify BrdU
16 incorporation (data not shown), but an increase in Ki67 expression was observed
17 only in treated WT mice (PBS: 1137±406.3 vs. DEN: 1728±455.1). By contrast, in FL-
18 HBx transgenic mice, treatment did not lead to an increase in the number of Ki67-
19 positive nuclei, consistent with the binucleation data (Fig. 7B). We also found p38
20 overactivation in FL-HBx transgenic mice, 48 hours after HCC initiation (Fig. 7C).

21
22 The percentage of binucleated cells became similar in both treated groups 75 days
23 after HCC initiation (WT: 26±4.1%, FL-HBx: 24±3.4%), but an expansion of the
24 tetraploid (4n) cell population was observed only in treated FL-HBx transgenic mice
25 (WT: 16 ±2.6%, FL-HBx: 21 ±3.7%) (Fig. 7D). This expansion was accompanied by
26 higher levels of p38 activation and changes to the cell cycle (increase of cyclin A2
27 and Plk1 transcripts) in treated FL-HBx transgenic mice relative to treated control
28 mice (Fig. 7C, E). We thus analyzed the expression of markers of HCC progenitor
29 cells 75 days after DEN injection (Fig. 7F). We detected an upregulation of Ly6D and
30 GpC3 mRNA levels in both treated groups, with significantly higher levels of Ly6D
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

transcription in FL-HBx transgenic mice than in controls. In addition, a significant transcription of AFP was detected only in treated FL-HBx transgenic mice. Thus, the changes in hepatocytes polyploidization mediated by FL-HBx enhance HCC initiation.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Discussion

1
2
3 We found that FL-HBx transiently modified the polyploidization of proliferating
4 hepatocytes during postnatal liver development, by delaying the establishment of
5 hepatocytes binucleation and inducing an early production of mononuclear polyploid
6 ($\geq 4n$) nuclei. This transient effect was probably associated with the profound changes
7 observed in the liver at weaning and a decrease in cell liver proliferation.⁽¹⁾ We
8 observed transcription defects in FL-HBx transgenic mice for genes encoding
9 proteins known to be modulated during hepatocyte maturation (C/EBP- α , PepCK and
10 AFP). Hepatocyte maturation is thus impaired, or at least delayed, in FL-HBx
11 transgenic mice. Indeed, it has been suggested that liver cell polyploidization may be
12 associated with terminal differentiation and cellular senescence.⁽¹⁾ Furthermore, in a
13 mouse model of liver proliferation, we showed that HBV infection induced similar
14 changes in the polyploidy of human hepatocytes.

15
16
17 We showed that the time course of polyploidy modulation in FL-HBx transgenic mice
18 was associated with aberrant G1/S and G2/M cell-cycle transitions. In FL-HBx
19 transgenic mice, Cdc6 upregulation may cause the unscheduled entry of cells into S-
20 phase. Our findings are consistent with previous reports that in vitro, HBx protein may
21 contribute to DNA re-replication and polyploidization by inducing overproduction of
22 the Cdc6 and Cdt1 proteins.^(26, 35) We observed an activation of the G2/M DNA
23 damage checkpoint, blocking entry into mitosis in response to the increase in DNA
24 damage in FL-HBx transgenic mice. The cell-cycle delay induced by HBx may be
25 linked to activation of the ATM-Chk2 checkpoint pathway.⁽²²⁾ Alternatively, HBx may
26 participate in mitotic checkpoint dysregulation, possibly by increasing centrosome
27 numbers.⁽²⁴⁾ During physiological liver cell proliferation, Plk1 transcript levels were
28 upregulated in FL-HBx transgenic mice. Plk1 has been shown to be involved in
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

checkpoint recovery and may also participate in the propagation of DNA damage.⁽³⁶⁾

Furthermore, the HBx protein has been reported to attenuate DNA damage checkpoint activation by upregulating Plk1 expression, thereby promoting the polyploidization of hepatocytes.⁽³⁷⁾

During the cell cycle, p38 α is involved not only in the entry of cells into mitosis, but also in responses to various stress agents, regulating DNA repair, cell cycle arrest and apoptosis.^(31, 32) In addition, the p38 MAPK plays a role in the formation of polyploid nuclei during liver development, by regulating the cytoskeleton and cytokinesis of hepatocytes.^(32, 38) The p38/ERK MAPKs pathways were strongly activated in FL-HBx transgenic mice, and this activation may be associated with lower levels of DNA repair proteins. Indeed, p38 MAPK inhibition leads to an increase in levels of the DNA repair protein Mre11 and a partial recovery of physiological polyploidy levels. It is possible that p38 MAPK is not completely inhibited or that additional pathways participate in the abnormal polyploidy observed in FL-HBx transgenic mice. Along these lines, HBx has been reported to stimulate cell-cycle progression by decreasing the expression of miR-122, which has been shown to be essential for liver polyploidization.^(39, 40) Furthermore, the HBx protein has been reported to activate the oncogene Yes-associated protein, which promotes cell polyploidization through the loss of Hippo signaling.^(41, 42)

We previously showed that FL-HBx sensitizes hepatocytes to DEN-induced HCC.⁽³⁴⁾

We therefore investigated the effects of FL-HBx on i) HCC initiation/promotion, ii) the associated hepatocyte polyploidy profile and iii) the possible involvement of these effects in participate to HCC development. Despite the strong induction of DNA damage, Mre11 and Rad51 expression, ChK1 activation and apoptosis induction were lower in FL-HBx transgenic. These findings may explain the larger number of hepatocytes with pH2AX foci, indicating that FL-HBx does not only induce an

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

increase in the number of polyploid hepatocytes, but also promotes their survival. Furthermore, during HCC initiation/promotion, an increase in IL-6 gene transcription was observed in FL-HBx transgenic mice. Consistent with our findings, an enhancement of the IL-6/STAT3 and Wnt/ β -catenin pathways has been shown to increase the tumorigenicity of hepatic progenitor cells in HBx transgenic mice.⁽⁴³⁾ IL-6 production has been reported to be associated with the impairment of liver function during chronic hepatitis and HCC in HBV-infected patients.⁽⁴⁴⁾ By modulating IL-6 levels during HCC initiation/promotion, FL-HBx may establish a favorable cellular microenvironment for the growth of initiated hepatocytes.

In the DEN model, HCC initiation/promotion was clearly associated with an inhibition of hepatocytes binucleation and aberrant nuclear polyploidization. Untreated FL-HBx transgenic mice had polyploidy and proliferation profiles similar to those of initiated hepatocytes. The FL-HBx protein may, therefore, activate signaling pathways similar to those activated by DEN treatment, leading to the induction of aberrant hepatocyte polyploidization. Moreover, after HCC initiation, changes to the cell cycle and persistent of polyploid nuclei (4n) were observed only in treated FL-HBx transgenic mice. In particular, as in physiological liver proliferation, an upregulation of Plk1 transcripts was observed in initiated hepatocytes. Interestingly, one recent study demonstrated that Plk1 acts as a proviral host factor favoring HBV replication in vitro.^(45,46) Furthermore, Plk1 overproduction is associated with early HCC development and a poor prognosis.⁽⁴⁷⁾

Overall, our data provide in vivo evidence in favor of HBx-induced changes in liver cell polyploidization during physiological and pathological liver proliferation leading to DNA damage propagation (Fig. 8). This was mediated by the activation of p38/ERK pathways inducing Plk1 overexpression. In addition, HBx properties in the increase of

inflammatory environment during liver injury participates in the transformation of hepatocytes.

In conclusion HBV-associated tumors are characterized by high levels of genetic instability, which is a risk factor for HCC development, and the HBx protein may itself increase genomic instability.⁽¹¹⁾ However, evaluations of the specific role of polyploidy changes in liver injury are required, together with extensive examinations of the complete landscape of chromosomal instability related to HBV- and HBx-induced disease, for a full understanding of HCC development.

ACKNOWLEDGEMENTS.

We thank Sophie Berissi and Noemie Gadessaud from the histological platform (Inserm US24/CNRS UMS3633) for tissue processing and slide staining, Serban Morosan and Olivier Bregerie from the animal facility (UMS28 *phénotyage du petit animal*, Université Pierre & Marie Curie - Paris VI) for animal care.

REFERENCES

- 1) Gentric G, Desdouets C. Polyploidization in liver tissue. *Am J Pathol* 2014;184:322-331.
- 2) Duncan AW, Taylor MH, Hickey RD, Hanlon Newell AE, Lenzi ML, Olson SB, et al. The ploidy conveyor of mature hepatocytes as a source of genetic variation. *Nature* 2010;467:707-710.
- 3) Toyoda H, Bregerie O, Vallet A, Nalpas B, Pivert G, Brechot C, et al. Changes to hepatocyte ploidy and binuclearity profiles during human chronic viral hepatitis. *Gut* 2005;54:297-302.
- 4) Guidotti JE, Bregerie O, Robert A, Debey P, Brechot C, Desdouets C. Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes. *J Biol Chem* 2003;278:19095-19101.
- 5) Kudryavtsev BN, Kudryavtseva MV, Sakuta GA, Stein GI. Human hepatocyte polyploidization kinetics in the course of life cycle. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1993;64:387-393.
- 6) Margall-Ducos G, Celton-Morizur S, Couton D, Bregerie O, Desdouets C. Liver tetraploidization is controlled by a new process of incomplete cytokinesis. *J Cell Sci* 2007;120:3633-3639.
- 7) Celton-Morizur S, Merlen G, Couton D, Margall-Ducos G, Desdouets C. The insulin/Akt pathway controls a specific cell division program that leads to generation of binucleated tetraploid liver cells in rodents. *J Clin Invest* 2009;119:1880-1887.
- 8) Duncan AW, Hanlon Newell AE, Smith L, Wilson EM, Olson SB, Thayer MJ, et al. Frequent aneuploidy among normal human hepatocytes. *Gastroenterology* 2012;142:25-28.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- 9) Pandit SK, Westendorp B, de Bruin A. Physiological significance of polyploidization in mammalian cells. *Trends Cell Biol* 2013;23:556-566.
 - 10) Gentric G, Maillet V, Paradis V, Couton D, L'Hermitte A, Panasyuk G, et al. Oxidative stress promotes pathologic polyploidization in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2015;125:981-992.
 - 11) Levrero M, Zucman-Rossi J. Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2016;64:S84-101.
 - 12) Kawai H, Suda T, Aoyagi Y, Isokawa O, Mita Y, Waguri N, et al. Quantitative evaluation of genomic instability as a possible predictor for development of hepatocellular carcinoma: comparison of loss of heterozygosity and replication error. *Hepatology* 2000;31:1246-1250.
 - 13) Kew MC. Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26 Suppl 1:144-152.
 - 14) Bandopadhyay M, Sarkar N, Datta S, Das D, Pal A, Panigrahi R, et al. Hepatitis B virus X protein mediated suppression of miRNA-122 expression enhances hepatoblastoma cell proliferation through cyclin G1-p53 axis. *Infect Agent Cancer* 2016;11:40.
 - 15) Qiao L, Leach K, McKinstry R, Gilfor D, Yacoub A, Park JS, et al. Hepatitis B virus X protein increases expression of p21(Cip-1/WAF1/MDA6) and p27(Kip-1) in primary mouse hepatocytes, leading to reduced cell cycle progression. *Hepatology* 2001;34:906-917.
 - 16) Wu BK, Li CC, Chen HJ, Chang JL, Jeng KS, Chou CK, et al. Blocking of G1/S transition and cell death in the regenerating liver of Hepatitis B virus X protein transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340:916-928.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- 17) Quetier I, Brezillon N, Duriez M, Massinet H, Giang E, Ahodantin J, et al. Hepatitis B virus HBx protein impairs liver regeneration through enhanced expression of IL-6 in transgenic mice. *J Hepatol* 2013;59:285-291.
 - 18) Na TY, Ka NL, Rhee H, Kyeong D, Kim MH, Seong JK, et al. Interaction of hepatitis B virus X protein with PARP1 results in inhibition of DNA repair in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2016;35:5435-5445.
 - 19) Bontron S, Lin-Marq N, Strubin M. Hepatitis B virus X protein associated with UV-DDB1 induces cell death in the nucleus and is functionally antagonized by UV-DDB2. *J Biol Chem* 2002;277:38847-38854.
 - 20) Qadri I, Fatima K, Abde LHH. Hepatitis B virus X protein impedes the DNA repair via its association with transcription factor, TFIIH. *BMC Microbiol* 2011;11:48.
 - 21) Yue D, Zhang Y, Cheng L, Ma J, Xi Y, Yang L, et al. Hepatitis B virus X protein (HBx)-induced abnormalities of nucleic acid metabolism revealed by (1)H-NMR-based metabonomics. *Sci Rep* 2016;6:24430.
 - 22) Kim S, Lee HS, Ji JH, Cho MY, Yoo YS, Park YY, et al. Hepatitis B virus X protein activates the ATM-Chk2 pathway and delays cell cycle progression. *J Gen Virol* 2015;96:2242-2251.
 - 23) Cheng B, Zheng Y, Guo X, Wang Y, Liu C. Hepatitis B viral X protein alters the biological features and expressions of DNA repair enzymes in LO2 cells. *Liver Int* 2010;30:319-326.
 - 24) Forgues M, Difilippantonio MJ, Linke SP, Ried T, Nagashima K, Feden J, et al. Involvement of Crm1 in hepatitis B virus X protein-induced aberrant centriole replication and abnormal mitotic spindles. *Mol Cell Biol* 2003;23:5282-5292.
 - 25) Yun C, Cho H, Kim SJ, Lee JH, Park SY, Chan GK. Mitotic aberration coupled with centrosome amplification is induced by hepatitis B virus X oncoprotein via the

Ras-mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein pathway. *Mol Cancer Res* 2004;2:159-169.

26) Rakotomalala L, Studach L, Wang WH, Gregori G, Hullinger RL, Andrisani O. Hepatitis B virus X protein increases the Cdt1-to-geminin ratio inducing DNA re-replication and polyploidy. *J Biol Chem* 2008;283:28729-28740.

27) Studach LL, Rakotomalala L, Wang WH, Hullinger RL, Cairo S, Buendia MA, et al. Polo-like kinase 1 inhibition suppresses hepatitis B virus X protein-induced transformation in an in vitro model of liver cancer progression. *Hepatology* 2009;50:414-423.

28) Brezillon N, Brunelle MN, Massinet H, Giang E, Lamant C, DaSilva L, et al. Antiviral activity of Bay 41-4109 on hepatitis B virus in humanized Alb-uPA/SCID mice. *PLoS One* 2011;6:e25096.

29) Fox DT, Duronio RJ. Endoreplication and polyploidy: insights into development and disease. *Development* 2013;140:3-12.

30) Schmit TL, Ahmad N. Regulation of mitosis via mitotic kinases: new opportunities for cancer management. *Mol Cancer Ther* 2007;6:1920-1931.

31) Awad MM, Enslin H, Boylan JM, Davis RJ, Gruppuso PA. Growth regulation via p38 mitogen-activated protein kinase in developing liver. *J Biol Chem* 2000;275:38716-38721.

32) Kurata S. Selective activation of p38 MAPK cascade and mitotic arrest caused by low level oxidative stress. *J Biol Chem* 2000;275:23413-23416.

33) Tarn C, Zou L, Hullinger RL, Andrisani OM. Hepatitis B virus X protein activates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in dedifferentiated hepatocytes. *J Virol* 2002;76:9763-9772.

34) Quetier I, Brezillon N, Revaud J, Ahodantin J, DaSilva L, Soussan P, et al. C-terminal-truncated hepatitis B virus X protein enhances the development of

diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinogenesis. *J Gen Virol* 2015;96:614-625.

35) Pandey V, Kumar V. HBx protein of hepatitis B virus promotes reinitiation of DNA replication by regulating expression and intracellular stability of replication licensing factor CDC6. *J Biol Chem* 2012;287:20545-20554.

36) Parrilla A, Cirillo L, Thomas Y, Gotta M, Pintard L, Santamaria A. Mitotic entry: The interplay between Cdk1, Plk1 and Bora. *Cell Cycle* 2016;15:3177-3182.

37) Studach L, Wang WH, Weber G, Tang J, Hullinger RL, Malbrue R, et al. Polo-like kinase 1 activated by the hepatitis B virus X protein attenuates both the DNA damage checkpoint and DNA repair resulting in partial polyploidy. *J Biol Chem* 2010;285:30282-30293.

38) Tormos AM, Rius-Perez S, Jorques M, Rada P, Ramirez L, Valverde AM, et al. p38alpha regulates actin cytoskeleton and cytokinesis in hepatocytes during development and aging. *PLoS One* 2017;12:e0171738.

39) Yu G, Chen X, Chen S, Ye W, Hou K, Liang M. MiR-19a, miR-122 and miR-223 are differentially regulated by hepatitis B virus X protein and involve in cell proliferation in hepatoma cells. *J Transl Med* 2016;14:122.

40) Hsu SH, Delgado ER, Otero PA, Teng KY, Kutay H, Meehan KM, et al. MicroRNA-122 regulates polyploidization in the murine liver. *Hepatology* 2016;64:599-615.

41) Zhang T, Zhang J, You X, Liu Q, Du Y, Gao Y, et al. Hepatitis B virus X protein modulates oncogene Yes-associated protein by CREB to promote growth of hepatoma cells. *Hepatology* 2012;56:2051-2059.

42) Zhang S, Chen Q, Liu Q, Li Y, Sun X, Hong L, et al. Hippo Signaling Suppresses Cell Ploidy and Tumorigenesis through Skp2. *Cancer Cell* 2017;31:669-684 e667.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- 43) Wang C, Yang W, Yan HX, Luo T, Zhang J, Tang L, et al. Hepatitis B virus X (HBx) induces tumorigenicity of hepatic progenitor cells in 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine-treated HBx transgenic mice. *Hepatology* 2012;55:108-120.
- 44) Wong VW, Yu J, Cheng AS, Wong GL, Chan HY, Chu ES, et al. High serum interleukin-6 level predicts future hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis B. *Int J Cancer* 2009;124:2766-2770.
- 45) Diab AM, Foca A, Fusil F, Lahlali T, Jalaguier P, Amirache F, et al. Polo-like-kinase 1 is a proviral host-factor for hepatitis B virus replication. *Hepatology* 2017.
- 46) Zhang H, Diab A, Fan H, Mani SK, Hullinger R, Merle P, et al. PLK1 and HOTAIR Accelerate Proteasomal Degradation of SUZ12 and ZNF198 during Hepatitis B Virus-Induced Liver Carcinogenesis. *Cancer Res* 2015;75:2363-2374.
- 47) He ZL, Zheng H, Lin H, Miao XY, Zhong DW. Overexpression of polo-like kinase1 predicts a poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients. *World J Gastroenterol* 2009;15:4177-4182.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Abnormal hepatocyte polyploidization and maturation in FL-HBx mice during liver development. (A) Liver sections stained for β -catenin and Hoechst. (B) Time-course analysis after birth of binucleate and mononucleate ($2n$, $\geq 4n$) hepatocytes and (C) percentages of binucleate and mononucleates ($2n$, $4n$, $\geq 8n$) hepatocytes at 3 months, in FL-HBx and control mice. (D) Liver sections from 17-day-old WT and FL-HBx mice stained for β -catenin, glutamine synthetase and Hoechst. (E) C/EBP- α , G6PD, PepCK and AFP transcript levels in livers of 17 day-old WT and FL-HBx mice. Bars: median. Unpaired Student's t tests; * p <0.05; ** p <0.005; **** p <0.00005.

Fig. 2. Profile of human hepatocyte ploidy in HBV-infected chimeric livers from uPA mice. (A) Experimental design for HBV-infected uPA^{+/+}/Scid/RAG/Gamma C humanized mice. (B) Quantification of human albumin and HBV DNA in sera 90 days after HBV infection. (C) Immunofluorescence of hepatocytes expressing human cytokeratin 18. Nuclei are stained with Hoechst (blue) (magnification x20 and x100). (D) Percentage of binucleate hepatocytes and of highly polyploid nuclei ($\geq 8n$) versus polyploid nuclei ($\geq 4n$) in human hepatocyte clusters from infected (90 days) and control humanized mice. Bars indicate the median. Unpaired Student's t tests; * p <0.05.

Fig. 3. Deregulation of G1/S and G2/M transitions in FL-HBx mice (A) Experimental design. (B) Time-course analysis of Ki67 expression and BrdU

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

incorporation in WT and FL-HBx mice. Immunohistochemical staining for Ki67 and BrdU staining and their quantification. (C) mRNA levels for the cyclins E1, A2 (CcnE1, CcnA2) and Cdc6 in the liver of WT and FL-HBx mice on the indicated days (D) Immunoblot analysis of cyclin D1 (CcnD1) and Cdk4 levels on the indicated days in FL-HBx mice and controls. Bars indicate the median. Unpaired Student's *t* tests; **p* <0.05; ***p* <0.005; *****p* <0.00005.

Fig. 4. Pathways regulating polyploidization and hepatocyte phenotype in postnatal FL-HBx mice. (A) Western-blot analysis of cyclin B1 (CcnB1), Mre11 and Rad51 levels and histone H3, Cdk1, and H2AX phosphorylation and (B) percentage of mitotic cells in WT and FL-HBx mice. Liver sections were stained for PCNA, pHH3 and Hoechst. Cells in G2 are PCNA⁺/pHH3⁺ and mitotic cells are PCNA⁻/pHH3⁺. (C) Immunoblot analysis of liver p38 and ERK phosphorylation in WT and FL-HBx mice. (D) Plk1 mRNA levels in livers of WT and FL-HBx mice. Bars: median. Unpaired Student's *t* tests; **p* <0.05; ***p* <0.005.

Fig. 5. Activation of p38 and ERK MAPKs drives abnormal polyploidization in FL-HBx mice. (A) Protocol of the p38 inhibition with SB203508. (B) number of Ki67- or BrdU-positive nuclei; (C) percentage of mitotic cells; (D) Plk1 mRNA level; (E) expression of pERK and Mre11, quantification normalized with β-actin; (F) Percentage of binucleate hepatocytes and 2n and ≥ 4n nuclei, in FL-HBx mice treated or not. Bars: median. Histograms: mean±SEM. Unpaired Student's *t* or Mann–Whitney *U* tests; **p* <0.05; ***p* <0.005.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Fig. 6. Enhancement of DEN-induced HCC initiation/promotion in FL-HBx mice 4 hours after DEN treatment. (A) Experimental design of HCC induction. (B) Gadd45- α , Bcl2, IL-6, TNF- α and TGF- β mRNA levels, normalized against WT mice receiving PBS; (C) liver sections stained for β -catenin, pH2AX and Hoechst, and the number of pH2AX-positive nuclei; (D) immunoblot analysis of H2AX, ChK1 phosphorylation, Mre11, Rad51 and caspase 3 levels, in the livers of WT and FL-HBx mice. Bars: median. Unpaired Student's *t* tests; **p* <0.05; ***p* <0.005.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Fig. 7. Polyploidy modification correlates with an increase of HCC progenitor markers in FL-HBx mice. (A) Percentage of binucleate hepatocytes and polyploid nuclei (2n, $\geq 4n$) and (B) Ki67-positive nuclei, 48 hours after HCC initiation; (C) p38 phosphorylation two and 75 days after HCC initiation, and quantification normalized with β -actin; (D) percentage of binucleate hepatocytes and polyploid nuclei (2n, 4n, $\geq 8n$); and levels transcription of (E) Cyclin A2 (CcnA2) and Plk1 and (F) Ly6D, GpC3 and AFP, in the livers of WT and FL-HBx mice. Bars: median. Histograms: mean \pm SEM. Unpaired Student's *t* or two-way ANOVA tests; **p* <0.05; ***p* <0.005; *****p* <0.00005.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Fig. 8. Schematic diagram of the proposed mechanism for HBx-induced pathological polyploidization and promotion of HCC.

Figure 1

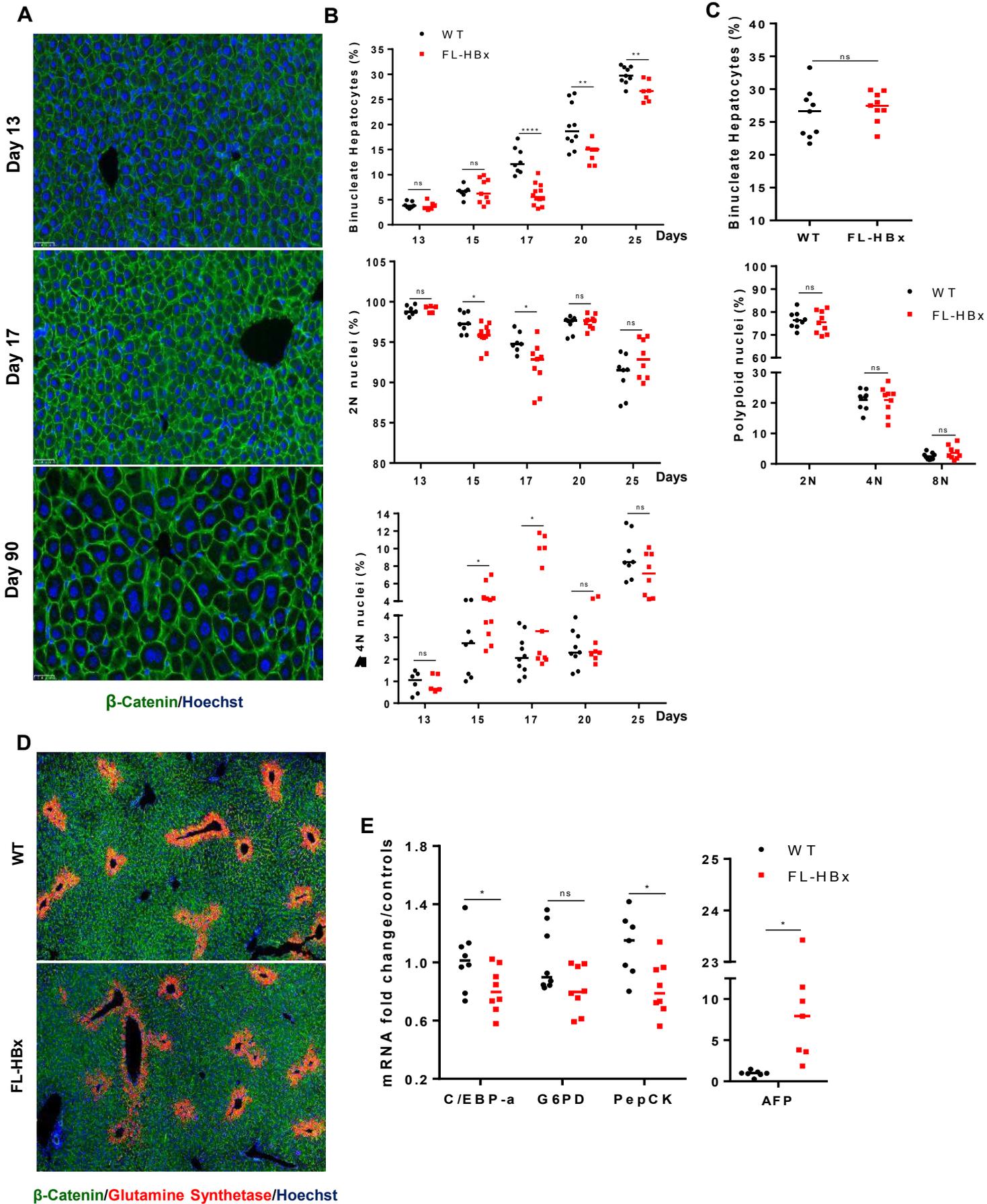
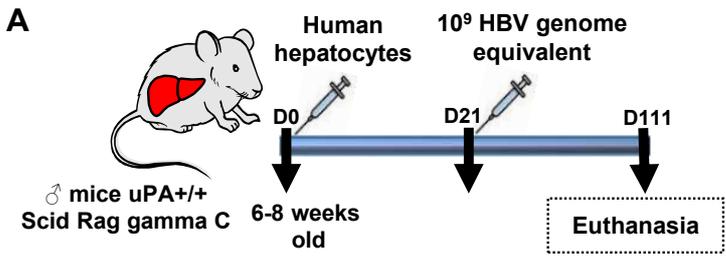
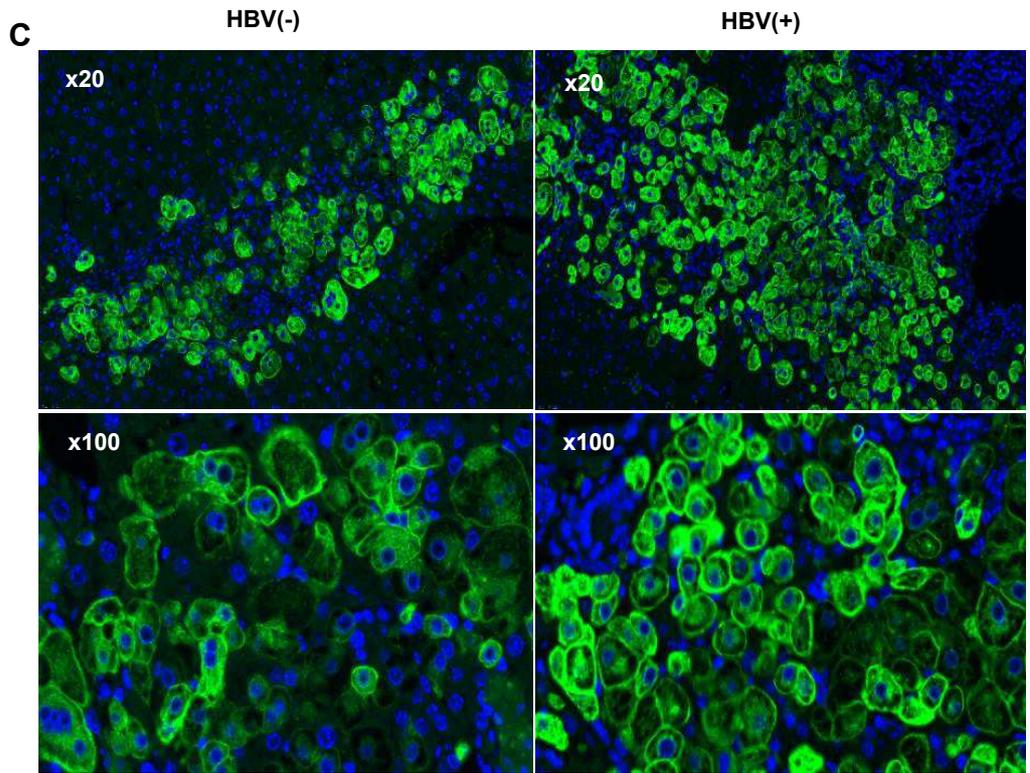


Figure 2



B

Mice ID	Status	hAlbumin (µg/ml)	HBV (copies/ml)
#34	-	1347	Undetectable
#35	-	907	Undetectable
#48	-	391	Undetectable
#68	HBV infected	667	7.0x10 ²
#CR194	HBV infected	822	4.1x10 ⁷
#CR195	HBV infected	412	1.5x10 ⁷



Human Cytokeratin 18/Hoechst

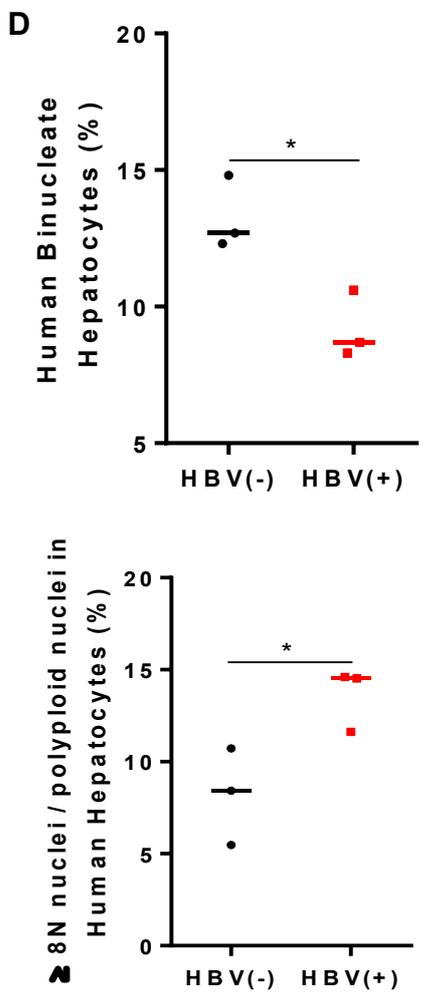


Figure 4

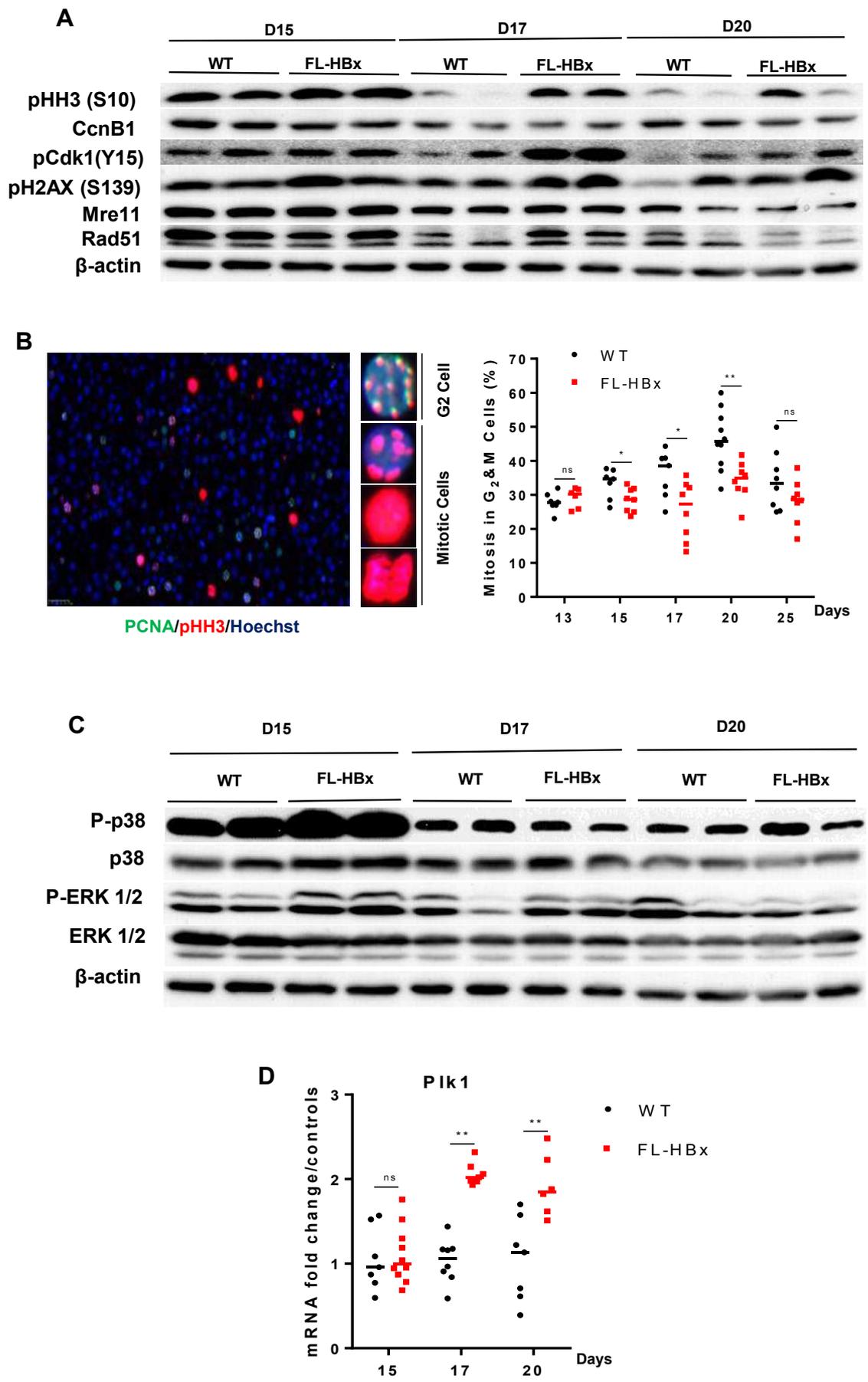


Figure 5

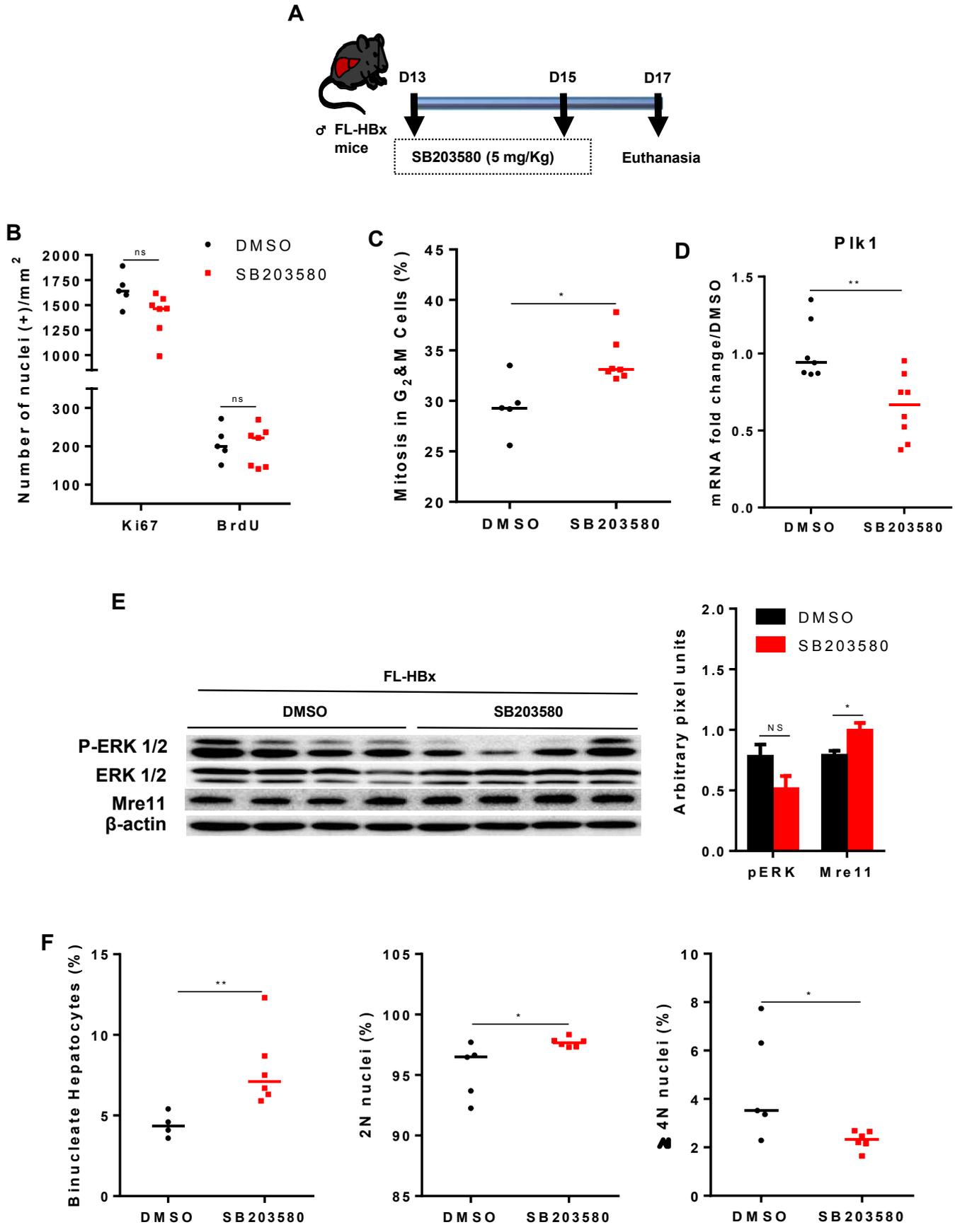


Figure 6

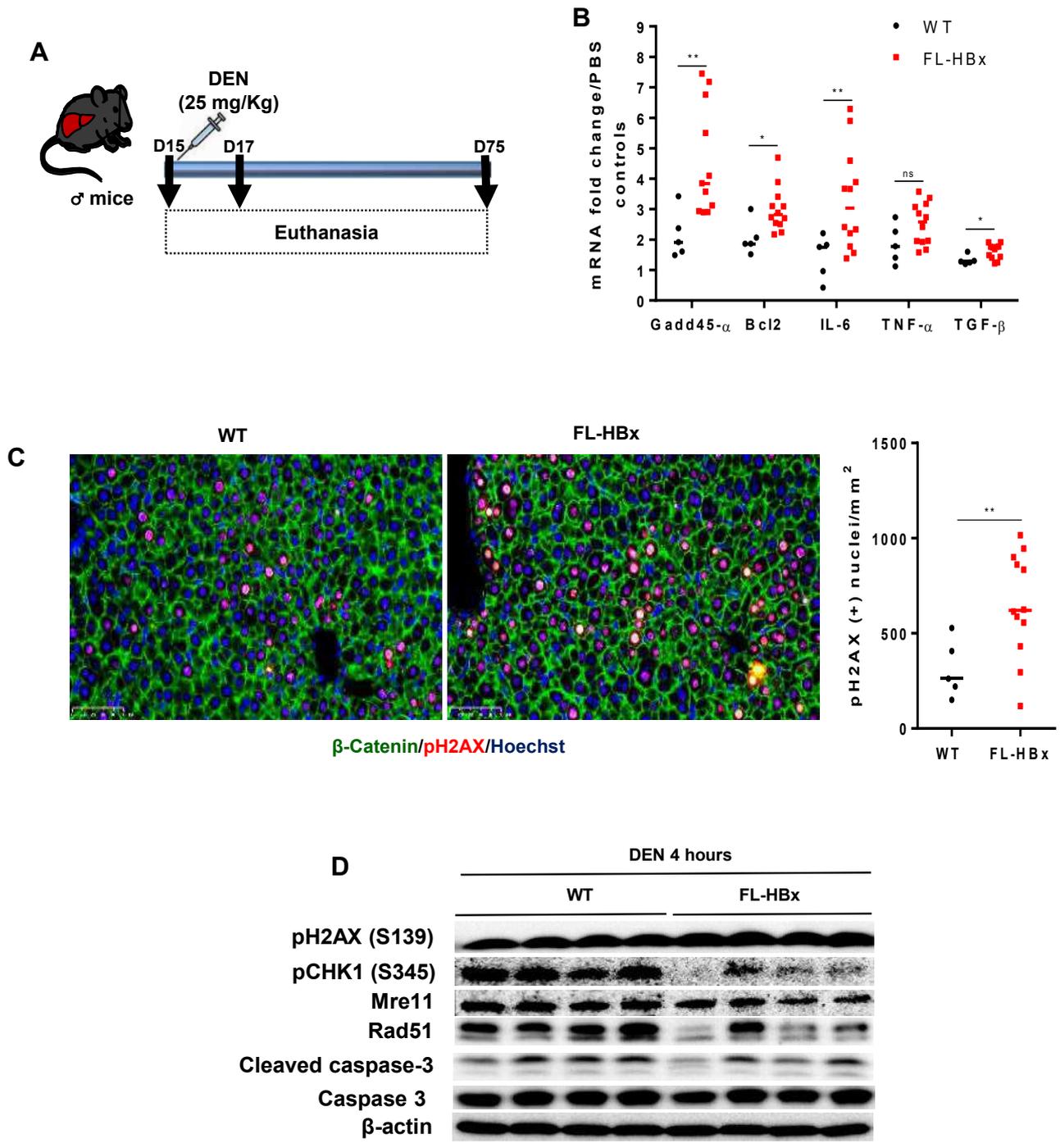


Figure 7

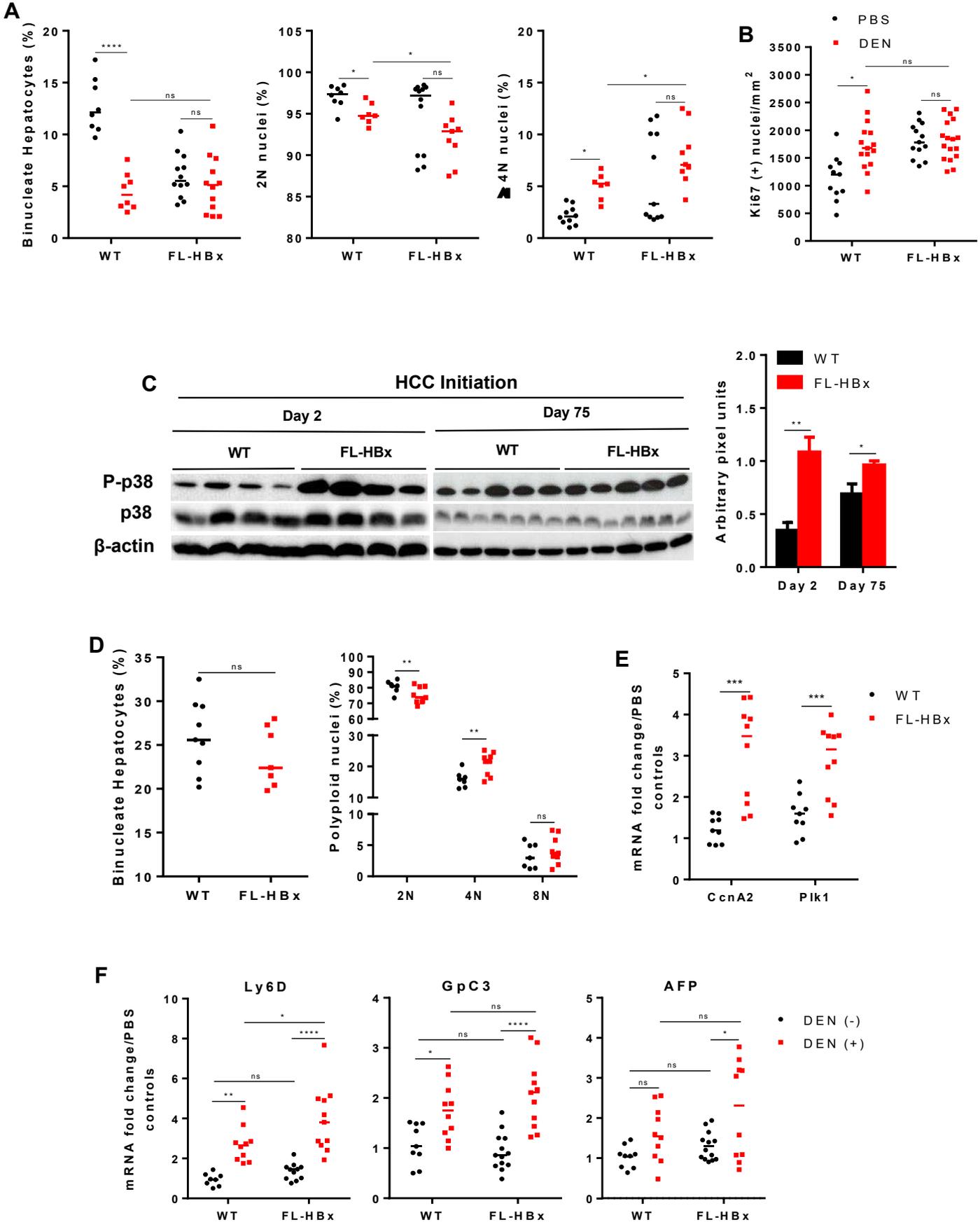
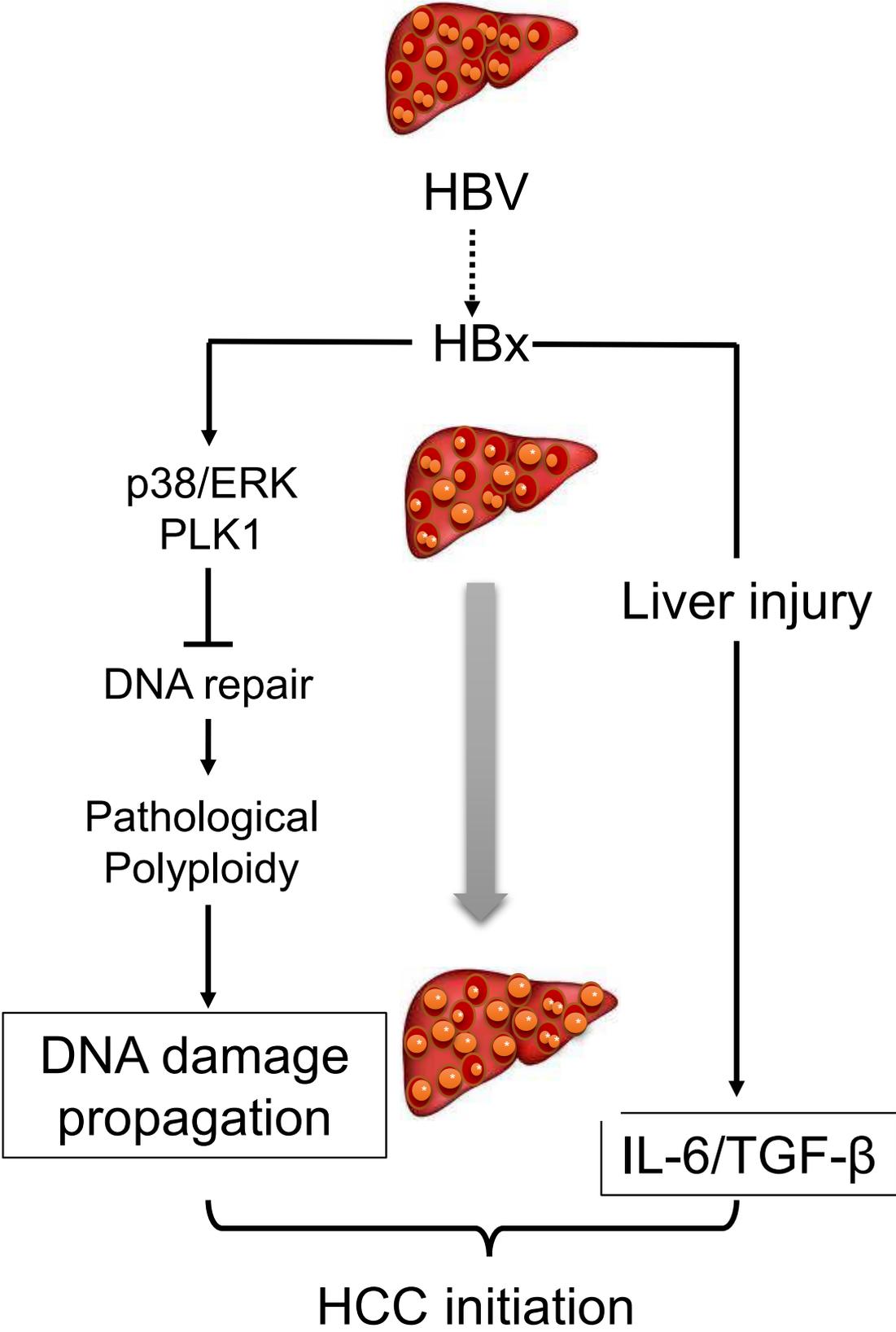


Figure 8



- Diploid (2n) hepatocyte
- Binucleate hepatocyte
- Nucleus with DNA damage
- Mononuclear polyploid hepatocyte

Hepatitis B virus X protein mediates aberrant polyploidization in the liver and enhances hepatocellular carcinoma initiation

James Ahodantin, Myriam Bou Nader, Corinne Cordier, Jérôme Mégret, Patrick Soussan, Chantal Desdouets, Dina Kremsdorf

Table of contents

Supplementary materials and methods-----	2
Supplementary Table1-----	6
Supplementary Figure 1-----	7

Supplementary materials and methods

Animal experiments

The mice were killed at the times indicated and their livers were perfused with 2% FCS in PBS. Liver samples were fixed overnight in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin or fixed overnight in 30% sucrose and frozen in OCT (Sakura Finetek). The rest of the biopsy specimen was snap-frozen in liquid nitrogen. Liver sections were stained (3 to 5 μm) and scanned with a Hamamatsu NanoZoomer scanner. All animal procedures were approved by the local animal care and use committee (Agreement A75-14-08) (nos.02890 and 02891), in accordance with French ethics regulations (Article L-1245-2 of the Huriet law).

Liver polyploidy and metabolic zonation

The cellular and nuclear ploidy of liver hepatocytes was analyzed as previously described⁽¹⁾. For cellular ploidy, the plasma membrane was immunostained with mouse anti- β -catenin (BD Biosciences) or human anti-cytokeratin 18 (Dako) antibody, and with an antibody against glutamine synthetase (Abcam) (1:200) for metabolic zonation, with detection by incubation with a secondary anti-mouse antibody conjugated with Alexa Fluor 488/555 (1:500) (Invitrogen). Nuclei were stained with Hoechst 33342 (Sigma). Binucleate cells were counted on 10 random high-power fields (about 1500 cells) on scans of stained liver sections. Nuclear ploidy was assessed automatically on scanned slides, as previously described.⁽²⁾

Analysis of mitotic cells

Liver sections were stained with a mouse anti-PCNA antibody (1:200) (Dako) and a rabbit anti-pHH3 antibody (1:200) (Santa Cruz).⁽¹⁾ Anti-mouse or anti-rabbit IgG

antibodies (1:500) conjugated with Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 555 (Invitrogen) were used as secondary antibodies. Mitotic cells were positive for the pHH3 antibody only, whereas G2 cells were double-stained with PCNA and pHH3 antibodies. Slides were scanned and cells in the M or G2 phase were counted on high-power fields. The percentage of cells in mitosis was obtained by dividing the number of pHH3⁺ PCNA⁻ nuclei by the sum of pHH3⁺ PCNA⁻ and pHH3⁺ PCNA⁺ nuclei (about 300 nuclei).

Histology and immunohistochemistry

After antigen retrieval and the inactivation of endogenous peroxidases with 3% H₂O₂ solution, paraffin-embedded liver sections were incubated overnight at 4°C with polyclonal anti-Ki67 antibody (1/3000, Abcam) or a monoclonal anti-BrdU antibody (1/200, Dako), and then for 1 hour with the PowerVision poly-HRP anti-mouse or -rabbit IgG antibodies (Dako or DiagoMics). They were then incubated with DAB to detect antibody binding (Dako or DiagoMics). Slides were counterstained with H&E. Three random high-power fields (magnification x10) were subjected to automatic counting with ImageJ software of the number of Ki67- or BrdU-labeled nuclei per mm².

Nucleic acid quantification

Total RNA was extracted from frozen liver tissues (Macherey Nagel RNA kit) and quantified with a Nanodrop spectrometer. RNA (2 µg) was used for reverse transcription with random primers and SuperScript II (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. We used 2 µl of diluted (1/10) cDNA for real-time PCR quantification with either the TaqMan or SyBr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) on a Taqman 7500 system (Applied Biosystems), with specific primers (Supplementary Table 1). The real-time PCR data were analysed by the comparative

Ct method⁽³⁾. Data were normalized against GAPDH as the housekeeping gene. HBV DNA was extracted from mouse sera and quantified as previously described.⁽⁴⁾

Analysis of protein levels

Total protein was extracted from frozen liver tissues in 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 1% SDS, 1% sodium deoxycholate, 1% Triton X-100, supplemented with a protease and phosphatase inhibitor cocktail (Pierce). Protein extracts were resolved by SDS-PAGE (12% acrylamide gel), transferred onto a nitrocellulose membrane and incubated with primary antibodies against the following proteins: Cdk4 (1/1000), pHH3 (1/1000), CcnB1 (1/500), Rad51 (1/500) (Santa Cruz), PCNA (1/1000) (Dako), CcnD1 (1/1000) (Interchim), phosphorylated (phosphor) p38 ,total p38, phospho ERK1/2, total ERK1/2, phospho H2AX, phospho Chk1, phospho Cdk1, cleaved caspase-3 (all at 1/1000) (Cell Signaling Technology), Mre11 (1/1000) (Abcam), and β -actin (1/1000) (Sigma). The secondary antibodies used were anti-mouse or anti-rabbit IgG antibodies coupled to horseradish peroxidase, and bands were detected with the ECL (Millipore) or ECL prime detection systems (Amersham), with a LAS 4000 CCD camera. Human albumin was quantified as previously described.⁽⁴⁾

Statistical analysis

Statistical significance was assessed in two-tailed unpaired Student's *t* tests, Mann–Whitney *U* tests, or two-way ANOVA, in Prism 6 (GraphPad software). Significant *p* values are indicated as follows: **p* < 0.05; ***p* < 0.005; ****p* < 0.0005; *****p* < 0.00005.

References

- 1) Fortier M, Celton-Morizur S, Desdouets C. Incomplete cytokinesis/binucleation in mammals: The powerful system of hepatocytes. *Methods Cell Biol* 2017;137:119-142.
- 2) Gentric G, Maillet V, Paradis V, Couton D, L'Hermitte A, Panasyuk G, et al. Oxidative stress promotes pathologic polyploidization in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2015;125:981-992.
- 3) Quetier I, Brezillon N, Duriez M, Massinet H, Giang E, Ahodantin J, et al. Hepatitis B virus HBx protein impairs liver regeneration through enhanced expression of IL-6 in transgenic mice. *J Hepatol* 2013;59:285-291.
- 4) Brezillon N, Brunelle MN, Massinet H, Giang E, Lamant C, DaSilva L, et al. Antiviral activity of Bay 41-4109 on hepatitis B virus in humanized Alb-uPA/SCID mice. *PLoS One* 2011;6:e25096.

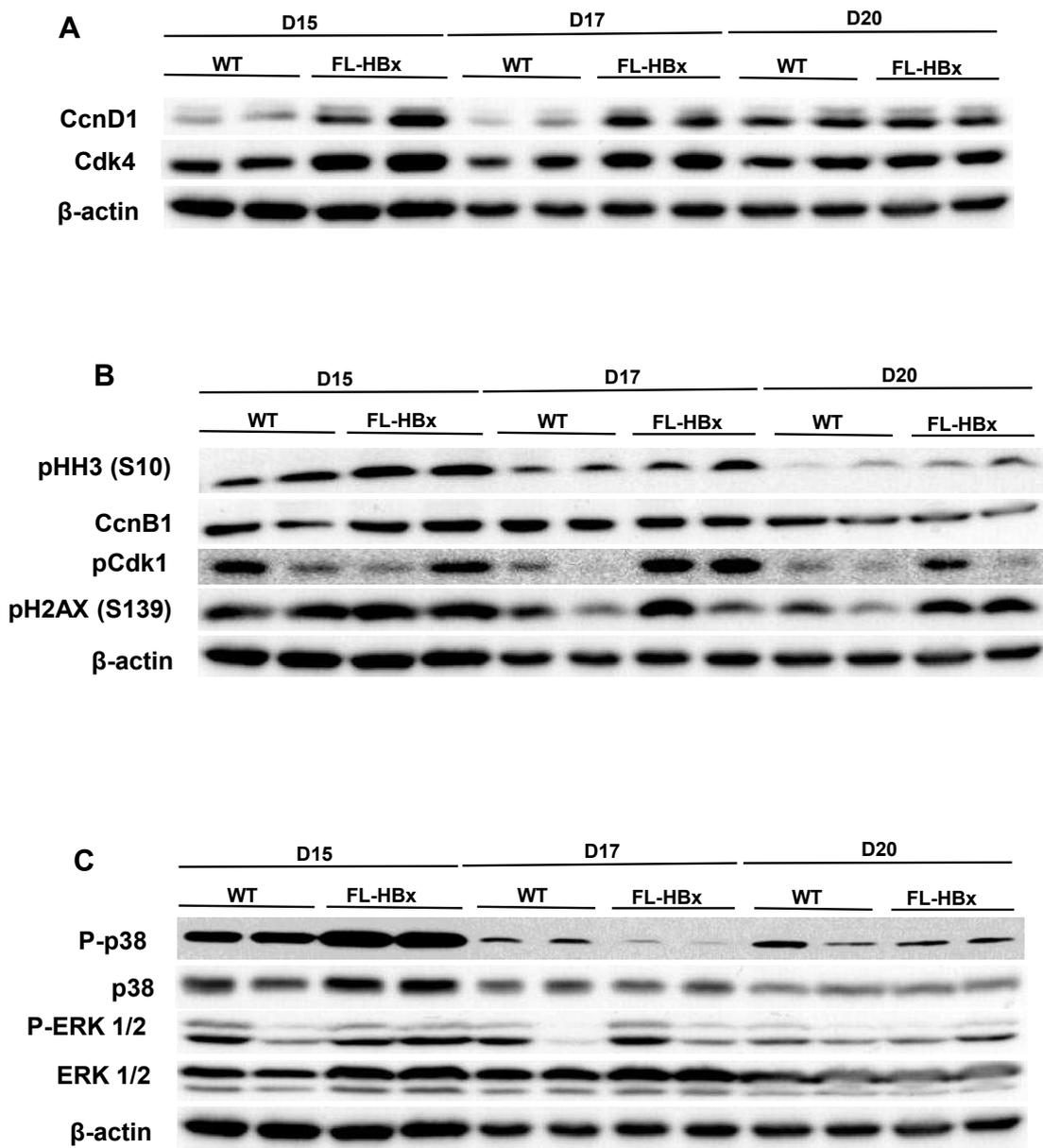
Supplementary Table1. List of mouse qPCR primers

Primers	Forward	Reverse
CcnE1	GAGAGACTCGACGGACCACAGCA	TGGGTCTTGCAAAAACACGGCCA
CcnA2	TCAAGACTCGACGGGTTGC	TCCATGAAGGACCAGCAGTG
Cdc6	CAAGACTTCAAGGAAGTAAAAGGCT	TGAGCAATAGCTGGGAACACA
PIk1	GATCTCAATTCACCGCAGCC	GGAGGGACCTCCTGCGAC
TGF- β	GTATTCCGTCTCCTTGGTTCA	CAACATGTGGA ACTCTACCAGA
TNF- α	GCTGAGCTCAAACCCTGGTA	GTTGGTCCCCCTTCTCCA
Gadd45- α	CTGTGTGCTGGTGACGAACCCAC	ATCACGGGCACCCACTGATCCAT
IL-6	GCTACCAA ACTGGATATAATCAGGA	CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA
Ly6D	AAACCGTCACCTCAGTGGAG	CATAGGTCAGTCTGGCAGCA
GpC3	CCCTGAATCTCGGAATTGAA	AGTCCCTGGCAGTAAGAGCA
AFP	ATTCCACTTCCAGCACTGCC	CTTTGGACGCAGCGAAATGT
C/EBP- α	TTCGGGTGCTGGATCTCTA	TTTCAGGCCACACCGGAATC
G6PD	CTGTCCCGGATCTACCTTGC	CACAGCAATGCCTGACAAGAC
PepCK	GGGTGGAAGGTCGAATGTGT	AGCCCTTAAGTTGCCTTGGG
Bcl2	IDT DNA : Mm.PT.51.10107528.g	

Legends of supplementary figures

Supplementary figure 1. Cell cycle alteration through p38 and ERK MAPKs pathways in FL-HBx transgenic mice. Immunoblot analysis of (A) cyclin D1 (CcnD1) and Cdk4 expression; (B) cyclins B1 (CcnB1) levels and Histone H3 (HH3), Cdk1, H2AX and (C) p38 and ERK phosphorylation, in WT and FL-HBx mice from day 15 to 20.

Supplementary Fig. 1





RESULTATS (B)





**PROTEINE HBX DU VIRUS DE L'HEPATITE B : IMPACT SUR LA
FIBROSE HEPATIQUE ET PROFIL DE POLYPLOIDIE ASSOCIE.**

James Ahodantin^{1,2,3}, Patrick Soussan^{1,2,3}, Chantal Desdouets^{4,5,6}, Dina Kremsdorf^{1,2,3}.

1. INSERM U1135 CIMI-PARIS, TEAM «PERSISTENT VIRAL INFECTIONS», PARIS, FRANCE.

2. UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE, PARIS, FRANCE.

3. CNRS, ERL 8255, PARIS, FRANCE

4. INSERM, U1016, INSTITUT COCHIN, PARIS, FRANCE.

5. CNRS, UMR8104, PARIS, FRANCE.

6. UNIVERSITE PARIS DESCARTES, SORBONNE PARIS CITE; PARIS, FRANCE.

(En préparation).

I. Contexte et rationnel de l'étude

Comme évoqué précédemment, l'infection chronique par le VHB joue un rôle majeur dans le développement de l'hépatite chronique, facteur de risque pour la survenue du CHC. Bien que, des altérations de la ploïdie hépatique (augmentation de la ploïdie nucléaire, diminution de la binucleation et aneuploïdie) aient été rapportées chez des patients ayant développé une fibrose, une cirrhose et un CHC (Attallah et al. 1999, El-Sayed et al. 2004, Toyoda et al. 2005, Gentric et al. 2015), la contribution de ces changements de polyploïdie dans la progression de la fibrose hépatique et du CHC suite à une infection VHB chronique reste à évaluer.

Par ailleurs, malgré une potentialisation de la fibrose hépatique rapportée dans des souris transgéniques exprimant le génome complet du VHB après traitement au tétrachlorure de carbone (CCL4) (Jin et al. 2011, Feng et al. 2017), aucune étude n'a à ce jour, démontré *in vivo* le rôle direct de la protéine FL-HBx dans le développement de la fibrose du foie. De plus, la contribution effective de la protéine FL-HBx dans la progression de la fibrose hépatique vers le CHC et les mécanismes sous-jacents tels que la régulation de la ploïdie et du métabolisme hépatique restent mal définis. Bien que, nous ayons observé au cours du développement postnatal du foie et de l'initiation du CHC, que la protéine FL-HBx est capable de déréguler les points de contrôle du cycle cellulaire conduisant à une polyploïdisation pathologique des hépatocytes et à une potentialisation de la survenue du CHC, la question de l'impact de la protéine FL-HBx sur la polyploïdie dans un contexte de maladie chronique du foie telle que la fibrose et la part de ces éventuelles altérations de la ploïdie dans la progression de la maladie vers le CHC reste à explorer.

Pour y répondre, une fibrose hépatique a été induite par le CCL4. En effet, le CCl4 est l'hépatotoxine la plus couramment utilisée dans l'étude de la fibrose chez les rongeurs. Par de nombreux aspects, ce modèle simule la fibrose hépatique humaine (Delire et al. 2015). Le métabolisme du CCL4 par le foie repose sur l'activité du cytochrome CYP2E1 et permet la production de radicaux trichlorométhyle. Ceux-ci sont impliqués dans des processus de réactions aux radicaux libres et de peroxydations des lipides (Basu 2003, Weber et al. 2003) qui contribuent à la phase aiguë caractérisée par la nécrose des hépatocytes centro-lobulaires, l'activation des cellules de Kupffer et l'induction d'une réponse inflammatoire (Heindryckx et al. 2009). Cette phase est associée à une production de cytokines, qui promeut l'activation des HSC, acteurs de la fibrose hépatique (Iwaisako et al. 2014).

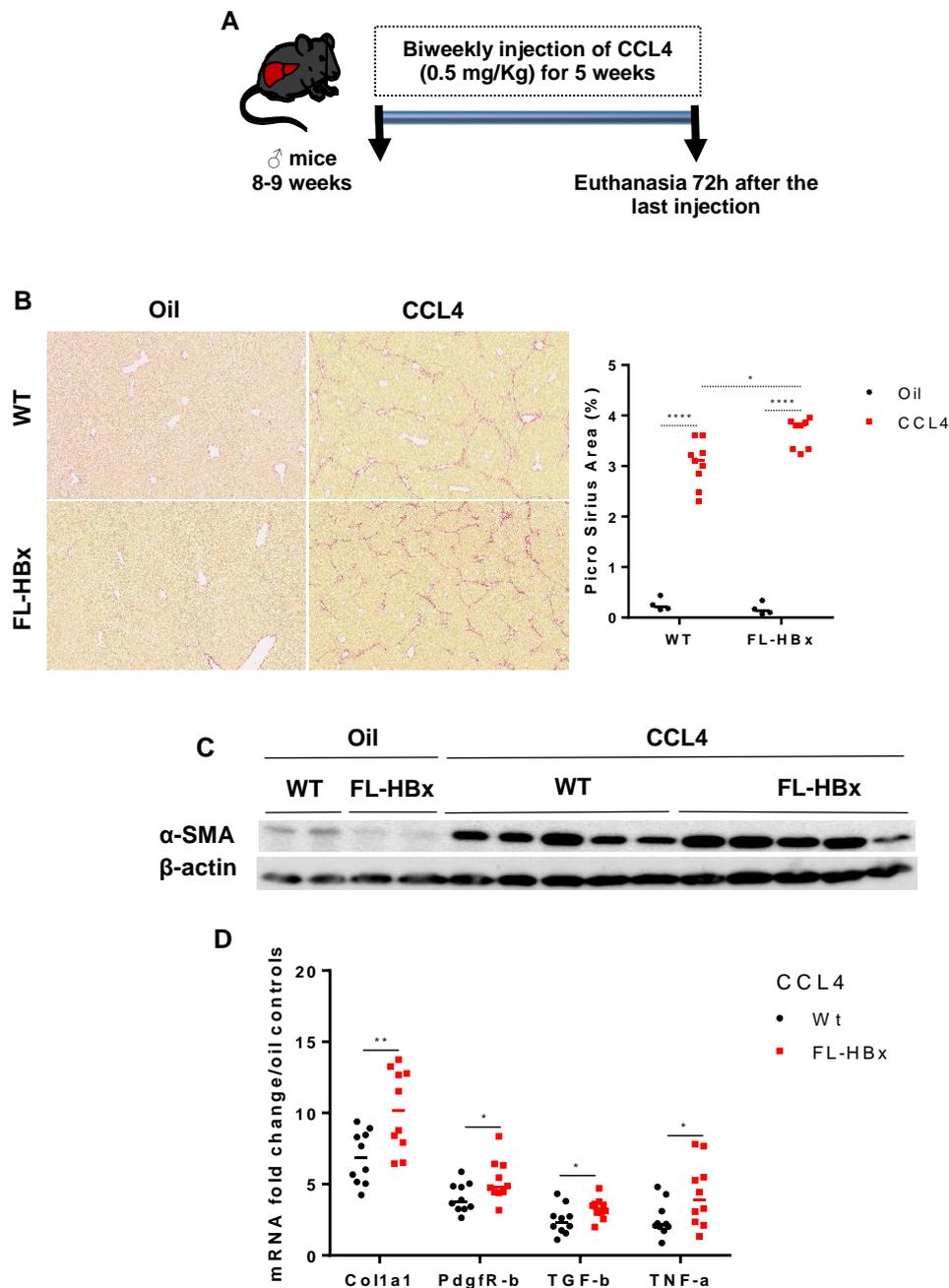


Figure 1 : Impact de la protéine FL-HBx au cours de la fibrose hépatique. (A) Protocole expérimental, (B) Image de la coloration au picros sirius et quantification des dépôts de collagènes dans le foie de souris Tg FL-HBx et contrôles après traitement par le CCL4 ou l'huile, (C) Analyse par western blot de l'expression d' α -sma, (D) Quantification par RT-qPCR des transcrits Col1a1, Pdgfr- β , TGF- β et TNF- α dans les animaux traités. Les résultats ont été normalisés par rapport aux souris sauvages traitées à l'huile. Les barres représentent la médiane et le test t de student a été utilisé pour l'analyse, * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$.

Dans notre étude, aussi bien des souris transgéniques (Tg) FL-HBx que des souris sauvages âgées d'environ 8 semaines, ont reçu en intrapéritonéal, deux injections hebdomadaires de CCL4 (0,5 mg/Kg) ou d'huile d'olive pendant cinq semaines. Les animaux ont ensuite été euthanasiés 72 heures après la dernière injection de CCL4 ou d'huile d'olive le foie prélevés pour analyses (Fig. 1A). L'étude de la polyploïdie cellulaire et nucléaire, et de la prolifération du foie après traitement par le CCL4 ou l'huile a été effectuée comme décrit dans les résultats (A). L'analyse de la fibrose a été effectuée par quantification (logiciel ImageJ) du dépôt de collagène sur des coupes de foie inclus en paraffine et colorées au picro-sirus. Le métabolisme et de la fibrose hépatique ont été évalués par immunohistochimie (IHC), western blot et RT-PCR quantitative (RT-qPCR).

II. Impact de la protéine HBx dans la maladie hépatique

A) Fibrose et polyploïdie hépatique :

Dans un premier temps, nous avons vérifié l'induction de fibrose dans les animaux après 5 semaines de traitement. L'analyse microscopique des coupes de foie colorées au picro-sirus montre par rapport aux contrôles, une augmentation du dépôt de collagènes dans le foie des souris ayant reçu le traitement CCL4 (Fig. 1B). La comparaison des deux groupes traités a révélé une quantité plus élevée de collagène dans les souris Tg FL-HBx suggérant une fibrose hépatique plus importante dans ces animaux (Fig. 1B). Cette observation a été confirmée par une augmentation de l'expression de la protéine α -sma dans les souris Tg FL-HBx. De plus, après le traitement, une transcription accentuée de *Coll1a1*, *Pdgfr- β* et *TGF- β* aussi bien que celle de la cytokine pro-inflammatoire *TNF- α* ont été observées dans les souris Tg FL-HBx comparées aux souris sauvages (Fig.1C et 1D).

Nous avons ensuite évalué l'impact de ce différentiel de fibrose sur la binucléation et le contenu en ADN des hépatocytes comme décrit dans le résultat (A). De façon intéressante, la fibrose induite par le CCL4 favorise un changement complet de la distribution des différents contingents polyploïdes (Fig. 2A et 2B). En effet, les souris traitées au CCL4 présentent une diminution importante du pourcentage d'hépatocytes binucléés (CCL4 : 13,5% vs Oil : 30%) et de noyaux diploïdes (2N) (CCL4 : 68% vs Oil : 78%) avec un niveau similaire de noyaux 4N, ceci associé à une augmentation du pourcentage de noyaux hautement polyploïdes ($\geq 8N$) (CCL4 : 11,5% vs Oil : 1,5%) indiquant que la fibrose induite par le CCL4 est associée à une

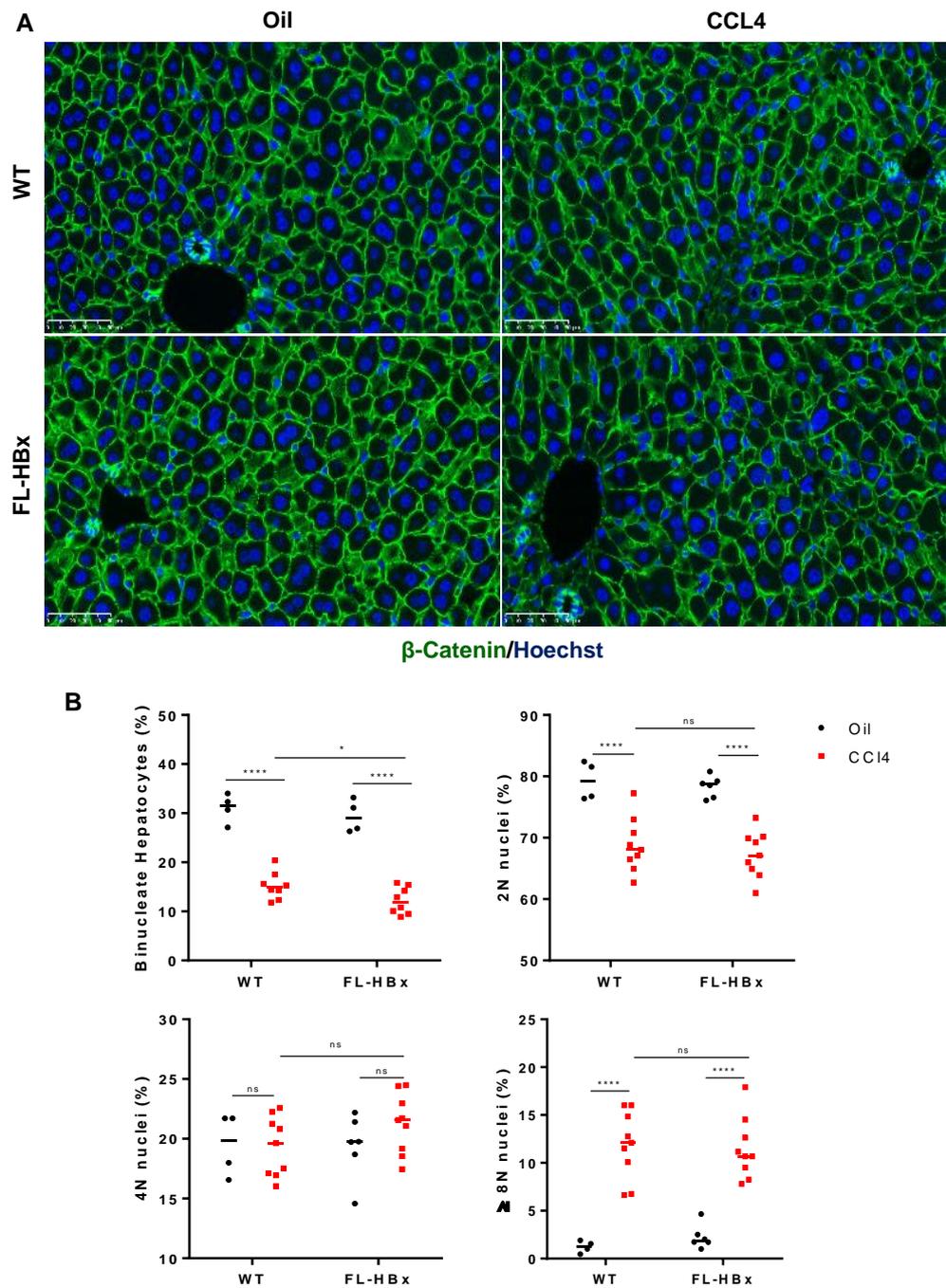


Figure 2 : Impact de la protéine FL-HBx sur la polyplôidie dans un contexte de fibrose hépatique. (A) Image d'immunofluorescence avec un anticorps anti β -caténine (membrane plasmique en vert) et du Hoechst (noyau en bleu) sur des coupes foie inclus en paraffine, (B) Pourcentage d'hépatocytes binucléés et de noyaux 2N, 4N et 8N chez les souris traitées et contrôles. Les barres représentent la médiane et le test t de student a été utilisé pour l'analyse, * $p < 0,05$; **** $p < 0,00005$.

polyplôidie pathologique du foie. De plus, la comparaison des deux groupes de souris traités montre une diminution significative ($15 \pm 2,7\%$ vs $12 \pm 2,7\%$) de la binucléation et une tendance à l'augmentation de noyaux 4N ($19 \pm 2,4\%$ vs $21 \pm 2,4\%$) dans les souris Tg FL-HBx (Fig. 2B).

Enfin, la régulation du cycle de prolifération des hépatocytes a été analysée afin de déterminer une éventuelle corrélation entre les observations précédentes et une prolifération pathologique du foie. Dans un 1^{er} temps, l'expression de l'antigène Ki67, un marqueur de cellules en phase active du cycle cellulaire (G1, S, G2 et M), a été évaluée par IHC (des coupes de foie inclus en paraffine) (Fig. 3A). L'analyse automatique d'une dizaine de champs aléatoires à l'aide du logiciel ImageJ a révélé un nombre plus élevé de noyaux Ki67 positifs dans les souris Tg FL-HBx comparés aux animaux sauvages après le traitement par le CCL4 (Fig. 3A). Cette observation a été ensuite confirmée par une augmentation plus importante de la cycline D1 dans les souris Tg FL-HBx, indiquant un nombre élevé d'hépatocytes en phase G1 du cycle cellulaire dans les animaux Tg FL-HBx traités. Après traitement, une augmentation significative de la transcription de la cycline A2, marqueur des phases S et G2, et de la polo-like kinase 1 (PLK1) impliquée dans l'atténuation des points de contrôle en G2/M, a été également détectée dans les souris Tg FL-HBx comparées aux contrôles (Fig 3B et 3C). De plus, l'analyse des voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire ont révélé une phosphorylation plus importante de p38 et d'ERK dans les souris Tg FL-HBx par rapport aux contrôles après traitement (Fig 3C).

B) Fibrose et métabolisme hépatique :

Au vu des précédents résultats, nous nous sommes interrogés sur l'impact de la fibrose sur le métabolisme hépatique notamment la capacité du foie à synthétiser de la glutamine, acide aminé important dans le cycle de l'urée. En effet, la dérégulation de la zonation métabolique du foie notamment la perte de l'expression de la glutamine synthétase (GS) peut participer à l'activation des HSC et à la sévérité de la fibrose hépatique (Jalan et al. 2016). De plus, une corrélation entre la réduction du nombre d'hépatocytes GS⁺ et l'expression de TGF- β a été rapportée *in vivo* (Ueberham et al. 2004). Ainsi, l'analyse microscopique de l'expression de la glutamine synthétase par immunofluorescence sur des coupes de foie, a montré une perte massive de l'expression de cette enzyme dans le foie des animaux traités avec un phénotype plus prononcé dans les souris Tg FL-HBx (Fig. 4A). Cette diminution accrue de l'expression de la glutamine synthétase a été ensuite confirmée par l'analyse par western blot (Fig. 4B).

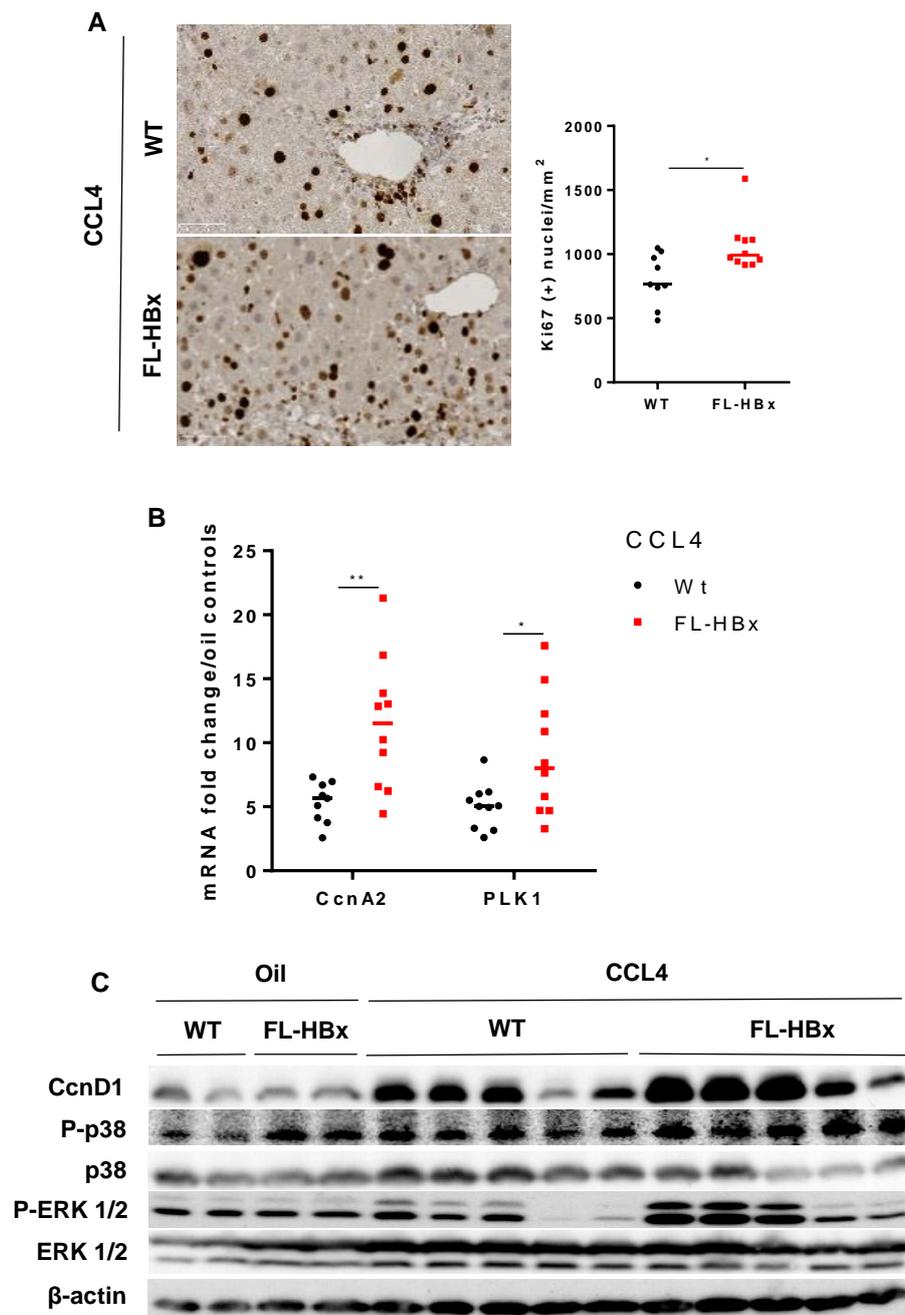


Figure 3 : Impact de la protéine FL-HBx sur la prolifération dans un contexte de fibrose hépatique. (A) Image IHC anti-Ki67 et quantification des noyaux Ki67⁺/mm² chez les animaux traités, (B) Quantification par RT-qPCR des transcrits CcnA2 et PLK1 chez les animaux traités, (C) Analyse par western de l'expression de CcnD1 et de la phosphorylation de p38 et ERK après traitement par le CCL4 ou l'huile. Les résultats ont été normalisés par rapport aux souris sauvages traitées avec de l'huile. Les barres représentent la médiane et le test t de student a été utilisé pour l'analyse, *p <0,05; **p <0,005.

Enfin, l'expression de marqueurs décrits comme participant à la progression de la fibrose vers le CHC a été analysée. De façon intéressante, la comparaison des deux groupes d'animaux traités a révélé une transcription plus élevée d'AFP, de Ly6D, d'EpCam, marqueurs de cellules progénitrices tumorales et de la vimentine, marqueur de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), dans les souris Tg FL-HBx (Fig. 4C).

C) Conclusion

Cette étude a permis pour la 1^{ère} fois, de mettre en évidence *in vivo*, que la protéine FL-HBx potentialise le développement de la fibrose induite par le CCL4. Ceci est associé à une diminution plus prononcée de la binucléation hépatique dans les souris Tg FL-HBx. Bien qu'une génération accrue de noyaux hautement polyploïdes ($\geq 8N$) ait été observée dans les deux groupes d'animaux traités, un différentiel significatif effectif n'a pu être observé en ce qui concerne la ploïdie nucléaire entre les deux groupes traités. Une altération plus marquée du cycle cellulaire corrélée à une suractivation des Mapk p38 et ERK est cependant détectée dans les souris Tg FL-HBx après traitement. De plus, la fibrose induite par le CCL4 est associée à une perte plus importante de l'expression de la glutamine synthétase dans les souris Tg FL-HBx. De façon intéressante, ces dernières présentent également une expression accrue de marqueurs de cellules progénitrices tumorales et de la TEM connus pour favoriser le développement de la tumeur primaire en permettant aux cellules transformées d'échapper à la sénescence et à l'apoptose et ainsi d'acquérir des propriétés de cellules souches (Giannelli et al. 2016).

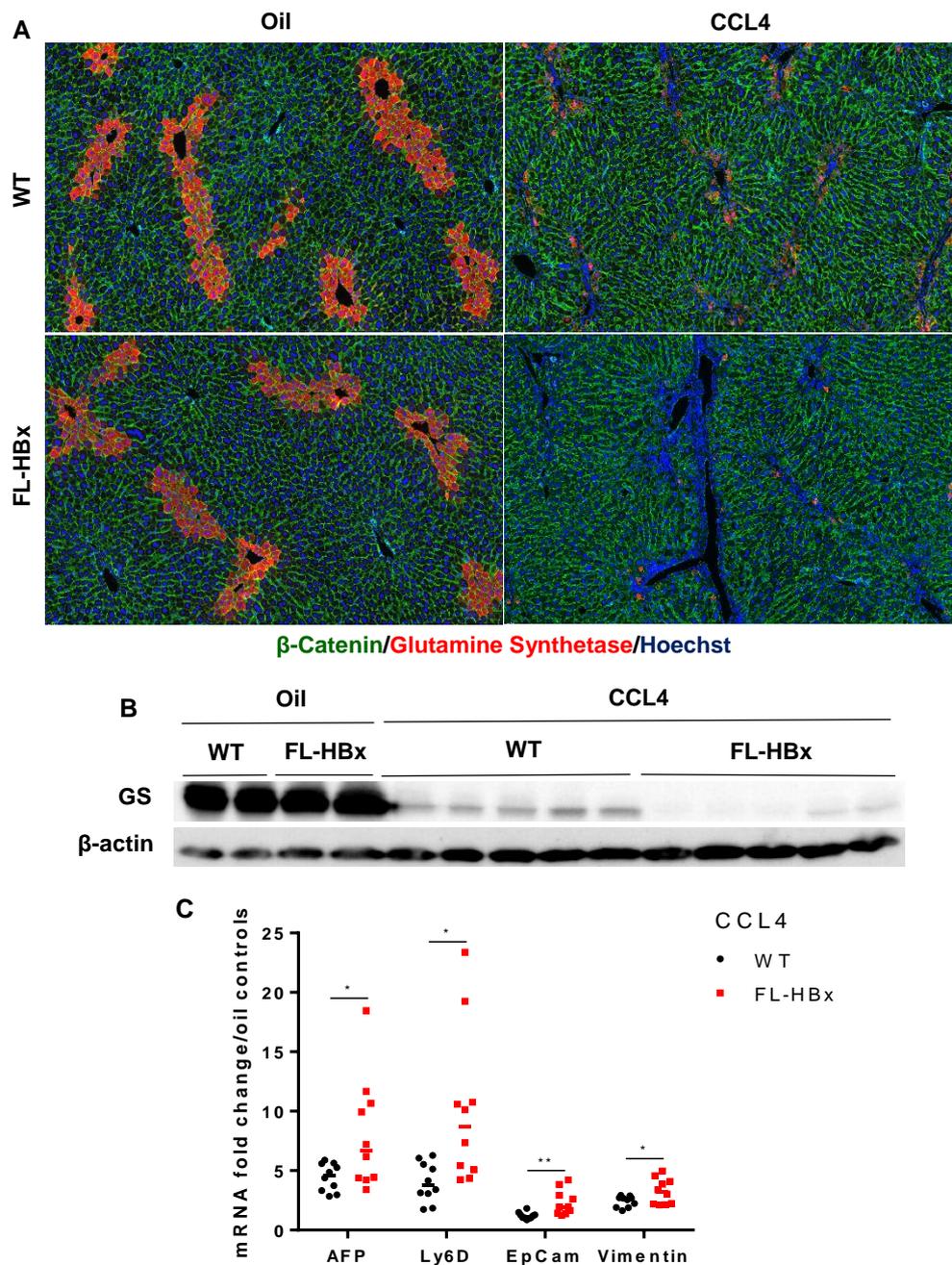


Figure 4 : Impact de la protéine FL-HBx sur le métabolisme et la progression de la fibrose hépatique. (A) Image d'immunofluorescence avec des anticorps anti β -caténine (membrane plasmique en vert), glutamine synthétase (en rouge) et du Hoechst (noyau en bleu) sur des coupes de foie inclus en paraffine, (B) Analyse par western de l'expression de la glutamine synthétase après traitement par le CCL4 ou l'huile, (C) Quantification par RT-qPCR des transcrits AFP, Ly6D, EpCam et Vimentine dans les animaux traités. Les résultats ont été normalisés par rapport aux souris sauvages traitées avec de l'huile. Les barres représentent la médiane et le test t de student a été utilisé pour l'analyse, *p < 0,05; **p < 0,005.



DISCUSSION ET PERSPECTIVES



La polyploïdisation des hépatocytes est une caractéristique importante du développement du foie et est décrite comme un mécanisme d'adaptation du foie en réponse au stress et aux lésions. Bien que, la fréquence des hépatocytes polyploïdes varie selon l'âge et l'espèce, jusqu'à 80% des hépatocytes adultes chez la souris et environ 40% chez l'homme sont polyploïdes. De plus, Il a été rapporté que la polyploïdisation favorise la mise en place d'une diversité génétique dans le foie de par les changements dynamiques de chromosomes qui se produisent lors de la prolifération des hépatocytes (Duncan 2013).

La protéine transactivatrice du virus de l'hépatite B (VHB), FL-HBx joue un rôle majeur aussi bien dans la réplication du VHB que dans l'induction d'instabilité génétique ou de dommages à l'ADN, rapportée comme une force motrice dans le développement du cancer du foie (Levrero et al. 2016). Cependant, les mécanismes par lesquels, la protéine FL-HBx favorise la perte de l'intégrité génomique et la transformation cellulaire au cours de la prolifération du foie demeurent mal définis. La question a été de savoir si la modulation de la polyploïdie hépatique par la protéine FL-HBx, pourrait être l'un des mécanismes utilisé par cette protéine virale dans la promotion d'altérations génétiques pouvant contribuer au développement du carcinome hépatocellulaire (CHC).

Au cours du développement postnatal du foie, nous avons observé que l'expression de la protéine FL-HBx retarde l'établissement de la binucléation hépatique indiquant soit des cytokinèses normales à la fin de la phase M soit une fréquence d'entrée en mitose moindre dans les souris Tg FL-HBx. En effet, dans le foie, le mécanisme principal conduisant à la polyploïdie hépatique est la cytokinèse incomplète. Des travaux de l'équipe de Desdouets, ont montré chez le rat que ce mécanisme est régulé par la voie insuline/AKT déclenchée par le changement de métabolisme des animaux après le sevrage (Celton-Morizur et al. 2009). En parallèle, nous avons observé comme décrit dans la littérature, que les hépatocytes sont majoritairement diploïdes (2N) dans les deux groupes de souris au cours de la 2^{ème} semaine après la naissance. Cependant, comparées aux souris contrôles, une augmentation précoce d'hépatocytes mononucléés polyploïdes ($\geq 4N$) a été détectée dans les souris Tg FL-HBx, suggérant que la diminution de la binucléation des hépatocytes exprimant la protéine FL-HBx serait plutôt en faveur de la fréquence réduite des événements de mitose. Ce profil de polyploïdisation des hépatocytes qui consiste en la génération d'hépatocytes mononucléés polyploïdes ($\geq 4N$) directement à partir d'hépatocytes diploïdes (2N) au détriment des hépatocytes binucléés a été rapporté comme pathologique car associé à de l'instabilité génétique (Gentric et al. 2015, Wang et al. 2017). De façon intéressante, nous avons observé dans les clusters humains de souris uPA

humanisées foie et infectées par le VHB, une diminution d'hépatocytes binucléés humains et une prédominance d'hépatocytes humains mononucléés hautement polyploïdes ($\geq 8N$). De plus à J17, les souris Tg FL-HBx présentent un phénotype d'hépatocytes moins différenciés (diminution de C/EBP- α , PepCK et augmentation d'AFP) indiquant une corrélation entre polyploïdie pathologique et un phénotype d'hépatocyte immature. En effet, la polyploïdisation hépatique participerait à la différenciation terminale du foie (Gentric et al. 2014). Cependant, cette polyploïdisation dite pathologique observée au cours du développement postnatal du foie dans les souris Tg FL-HBx, est transitoire ; ceci pouvant être lié à la forte diminution de la prolifération hépatique et au changement de métabolisme (transition allaitement/sevrage) qui se produisent dans le foie.

Bien que, les effets de la protéine FL-HBx sur la progression du cycle cellulaire demeurent controversés, nos données *in vivo*, démontrent que la polyploïdisation anormale des hépatocytes induite par la protéine FL-HBx est liée à la capacité de cette protéine virale à déréguler les transitions G1/S et G2/M du cycle cellulaire des hépatocytes. L'augmentation de l'expression des cyclines D, E1 et de Cdk4 dans les souris Tg FL-HBx, reflète une transition G1/S plus rapide des hépatocytes en présence de la protéine FL-HBx. De plus, dans les souris Tg FL-HBx, la régulation à la hausse de l'expression de Cdc6, facteur impliqué dans la re-réplication de l'ADN, indique que la protéine FL-HBx favorise une phase S plus longue. Ceci pourrait augmenter les taux d'erreurs liés à la réplication de l'ADN. De façon intéressante, des travaux *in vitro* ont rapportés que la protéine HBx favorise la re-réplication de l'ADN et à la polyploïdisation en induisant une surexpression des protéines Cdc6 et Cdt1 (Rakotomalala et al. 2008, Pandey et al. 2012). Ces erreurs de réplifications pourraient expliquer l'activation des points de contrôle de l'intégrité génomique (ATM/ATR, ChK1/2 et H2AX) responsable du blocage en G2/M des hépatocytes exprimant la protéine FL-HBx. En effet, des travaux ont rapporté un retard de la progression en G2/M suite à l'activation de la voie ATM-ChK2 par des dommages à l'ADN dans des cellules ChangX transfectées avec un plasmide codant pour la protéine HBx (Cheng et al. 2010, Kim et al. 2015). De plus, l'inhibition ou la réduction de l'expression des protéines Mre11 et Rad51, impliquées dans la réparation de l'ADN indique que la protéine FL-HBx favorise l'accumulation d'ADN endommagés. De façon intéressante, nos résultats montrent que la régulation à la hausse de l'expression de PLK1 par la protéine FL-HBx, via l'activation de p38/ERK, serait responsable de mitoses abortives résultant en la formation d'hépatocytes mononucléés polyploïdes (4N) avec matériel génétique altéré. Ces hépatocytes polyploïdes avec de l'ADN endommagé pourront re-entrer dans le cycle et générer

soit des hépatocytes de ploïdie plus élevée soit des cellules filles génétiquement instables favorisant ainsi la propagation d'ADN endommagés. Ce résultat suggère également que les hépatocytes exprimant la protéine FL-HBx échappent à l'apoptose liée à l'arrêt prolongé en G2/M au cours d'une prolifération du foie. Bien que l'inhibition de la voie p38 Mapk dans les souris Tg FL-HBx soit associée à une diminution de l'expression de PLK1, à une phosphorylation moindre d'ERK et une surexpression de Mre11, la restauration de la polyploïdie physiologique n'est cependant que partielle suggérant l'existence de voies alternatives ou additionnelles dans la régulation de la ploïdie hépatique. Ces données sont en accord avec celles rapportées dans des lignées d'hépatocytes immortalisés exprimant la protéine HBx de façon stable où a été rapportée, la capacité de la protéine HBx à favoriser l'atténuation des points de contrôle du cycle cellulaire par induction de l'expression de PLK1 (Studach et al. 2010). De plus, une étude récente a démontré que l'expression de miR-122 est indispensable à la polyploïdisation physiologique du foie (Hsu et al. 2016). De plus, une corrélation a été observée *in vitro* entre l'inhibition de l'expression de miR-122 par la protéine HBx et la stimulation de la progression des cellules HepG2 dans le cycle cellulaire (Yu et al. 2016). Plus encore, la voie Hippo/Yap décrite comme activée par la protéine HBx a été rapportée comme impliquée dans la polyploïdisation pathologique des hépatocytes (Zhang et al. 2012, Zhang et al. 2017). En effet, l'activation de Yap induit l'acétylation de la ligase E3 Skp2 via la voie Akt. De part sa localisation exclusivement cytoplasmique, Skp2 acétylée promeut une hyperaccumulation nucléaire de la protéine p27 conduisant à un blocage de la mitose puis à la formation de cellules polyploïdes. De plus, la dégradation de FoxO1/3 par Skp2 acétylée permet aux cellules polyploïdes d'échapper à l'apoptose conduisant à une augmentation de l'instabilité génétique puis à l'oncogenèse (Zhang et al. 2017). De façon intéressante, dans les souris Tg FL-HBx, le phénotype d'hépatocyte immature (C/EBP- α , PepCK diminués et AFP augmenté) corrèle avec la surexpression de PLK1 comme rapporté dans les CHC (He et al. 2009, Sun et al. 2014).

Au cours du développement postnatal du foie, l'absence d'hépatopathies particulières dans les souris Tg FL-HBx, pourrait s'expliquer par une polyploïdisation pathologique transitoire, qui ne permettrait pas une accumulation de dommages à l'ADN suffisante pour induire une maladie hépatique ou bien nécessiterait des facteurs additionnels comme ceux impliqués dans la promotion tumorale (facteurs de croissance, inflammation...).

Nous avons rapporté récemment que l'expression de la protéine FL-HBx sensibilise les hépatocytes au CHC induit par le DEN. La question a donc été de déterminer si la

potentialisation de la polyploïdisation pathologique et de l'inflammation induites par le DEN, pourrait être l'un des mécanismes utilisés par la protéine FL-HBx dans le développement du CHC.

De façon intéressante, les dommages à l'ADN induits par le DEN sont nettement potentialisés par la protéine FL-HBx (inactivation de ChK1 et inhibition de Mre11 et Rad51). En effet, la présence de dommages à l'ADN caractérisée par la phosphorylation de l'histone H2AX, induit l'activation des kinases ATM/ATR par phosphorylation. Ces dernières activent à leur tour par phosphorylation les protéines cellulaires telles ChK1/ChK2 empêchent la progression des cellules endommagées dans le cycle jusqu'à ce que l'ADN de ces dernières soit réparé ; au cas échéant, elles sont dirigées vers l'apoptose ou la sénescence (Zitouni et al. 2014). Ainsi, malgré l'augmentation de dommages à l'ADN au cours de l'initiation, les hépatocytes exprimant la protéine FL-HBx semblent moins sensibles à l'apoptose. Plus encore, l'initiation du CHC induite par le DEN est associée à une transcription plus élevée d'IL-6 et de TGF- β dans les souris Tg FL-HBx. En effet, dans le modèle DEN, l'induction de facteurs de croissance et de cytokine pro-inflammatoire notamment l'IL-6 a été rapportée comme promouvant l'initiation du CHC (He et al. 2010). De plus, il a été décrit que la suractivation des voies IL-6/STAT3 et Wnt/ β -caténine augmenterait la tumorigénicité des cellules progénitrices hépatiques chez les souris transgéniques HBx (Wang et al. 2012). Il a été également rapporté, que la production d'IL-6 est associée à une altération de la fonction hépatique au cours de l'hépatite chronique et du CHC chez les patients infectés par le VHB (Wong et al. 2009). Ceci indique que la protéine FL-HBx induit non seulement, l'augmentation du nombre d'hépatocytes génétiquement instables mais potentialise également leur survie en instaurant un microenvironnement favorable à leur expansion clonale.

Dans le modèle de CHC induit par le DEN, les étapes d'initiation et de promotion du CHC sont clairement associées dans les souris sauvages, à une inhibition de la binucléation des hépatocytes. De façon étonnante, les souris Tg FL-HBx non traitées présentent un profil de binucléation similaire à celui des souris traitées suggérant que la protéine FL-HBx et le DEN utiliseraient des voies similaires dans l'inhibition de la binucléation hépatique. En revanche, les souris Tg FL-HBx présentent une augmentation significative des hépatocytes mononucléés polyploïdes (4N) après l'initiation du CHC indiquant la présence d'un nombre plus élevé d'hépatocytes potentiellement initiés. De plus, dans les souris Tg FL-HBx, une corrélation entre l'altération de la polyploïdie et l'activation de p38, l'expression élevée de PLK1 et de marqueurs de progéniteurs de CHC (Ly6D et AFP) a été observée. Ces résultats montrent que

la polyploïdisation pathologique des hépatocytes participe à l'initiation du CHC mais nécessite un contexte inflammatoire (IL-6, TGF- β) pour une évolution vers le développement de la tumeur primaire. En accord avec ces données, il a été rapporté dans des lignées cellulaires, que l'inhibition de l'expression de PLK1 empêche la transformation cellulaire induite par la protéine HBx (Studach et al. 2009). De plus, des analyses de biopsies de patients, ont révélé une expression élevée de PLK1 mais similaire dans la cirrhose et le CHC indiquant que PLK1 est également surexprimée dans les étapes précédant l'apparition du CHC (Sun et al. 2014). Des observations similaires avaient été effectuées dans une autre étude chez des patients ayant développé un CHC de différentes étiologies et avaient proposé l'expression de PLK1 comme associée à un mauvais pronostic (He et al. 2009).

Une inflammation excessive et persistente dans le foie induit souvent un processus fibrogénique qui augmente le risque de la survenue d'un CHC. Ainsi, notre 2^{ème} étude a eu pour but de déterminer le rôle de la protéine FL-HBx dans le développement de la fibrose hépatique et le profil de ploïdie hépatique associée.

Les résultats de cette étude démontrent pour la 1^{ère} fois *in vivo*, que l'expression de la protéine FL-HBx potentialise le développement et la progression de la fibrose hépatique induite par le CCL4. Cependant, bien que nous rapportons au cours de la fibrose, une diminution plus importante de la binucléation hépatique corrélée à un renforcement de la prolifération des hépatocytes et à une suractivation des voies de signalisation p38/ERK Mapk dans les souris Tg FL-HBx, la génération de noyaux hautement polyploïdes ($\geq 8N$) semble similaire entre les souris transgéniques et les sauvages. L'absence de différentiel net en ce qui concerne la polyploïdie nucléaire entre les souris Tg FL-HBx et les sauvages peut être expliquée par différentes hypothèses :

- Les effets de la protéine FL-HBx sur la fibrose hépatique sont indépendants de la polyploïdie.
- L'impact de la protéine FL-HBx sur la polyploïdie est masqué par le traitement CCL4. En effet, comme observé dans notre étude, le traitement CCL4 induit une polyploïdisation pathologique des hépatocytes. Ceci est en accord avec les observations sur la ploïdie hépatique rapportées par d'autres travaux dans le cadre de traitement par le CCL4 (Clawson et al. 1992).
- Le protocole expérimental utilisé ne permet pas de différencier l'effet du CCL4 de celui d'HBx. En effet, le temps où les analyses de la polyploïdie ont été effectuées (72 heures

post-dernière injection) semble trop tard par rapport au temps habituel (48 heures) où la prolifération hépatique est la plus importante. Une cinétique aurait peut-être permis une étude plus fine de la polyploidie dans notre modèle.

Ces effets de la protéine FL-HBx sur la fibrose et la polyploidie hépatique mériteraient cependant d'être validés dans d'autres modèles de fibrose induite chimiquement, le thioacétamide (TAA), ou par ligation du cholédoque (BDL).

Comme évoqué ci-dessus, dans la fibrose induite par le CCL4, la présence de la protéine FL-HBx est associée non seulement à une augmentation de l'inflammation intrahépatique (TNF- α) mais également à une chute plus prononcée de l'expression de la glutamine synthétase (GS) reflétant le niveau de l'atteinte hépatique. Au cours d'une atteinte aiguë ou chronique du foie, la réduction de l'expression de la glutamine synthétase hépatique a été rapportée comme favorisant le développement d'une hyperammonémie souvent associée à une encéphalopathie hépatique et à une hypertension portale (Jalan et al. 2016). En effet, la GS exprimée spécifiquement par les hépatocytes périportaux, permet la détoxification de l'ammoniac en excès provenant du sang périportal par une réaction d'amidation du glutamate (Haussinger et al. 2007). La perte de l'expression de la GS conduisant à une altération du métabolisme de l'ammoniac dans le foie et à une augmentation de la concentration en ammoniac dans le sang périphérique a été rapportée comme fragilisant la barrière hémato-encéphalique (Schliess et al. 2002) conduisant donc à une encéphalopathie hépatique suite à l'altération de la fonction des astrocytes. De plus, une étude récente a rapporté que les souris déficientes en GS présentent une perte de la masse musculaire associée à une augmentation du tissu adipeux et à une accumulation de lipides intrahépatiques (Hakvoort et al. 2017). De façon intéressante, une diminution de la binucléation hépatique associée à une augmentation d'hépatocytes hautement polyploïdes a été décrite chez les souris *ob/ob* (Gentric et al. 2015).

De façon surprenante, au cours de la fibrose induite par le CCL4, les souris Tg FL-HBx présentent une expression plus élevée de PLK1, de marqueurs de cellules progénitrices tumorales (AFP, Ly6D et EpCam) et de la transition épithélio-mésenchymateuse (Vimentine) indiquant une transformation cellulaire plus avancée et un risque plus élevé de la progression de la fibrose vers le CHC en présence de la protéine FL-HBx.

En conclusion, aussi bien au cours du développement postnatal que dans la maladie hépatique, la protéine FL-HBx induit une polyploidisation pathologique des hépatocytes associée une augmentation de dommages à l'ADN. Ces observations sont médiées par une surexpression de

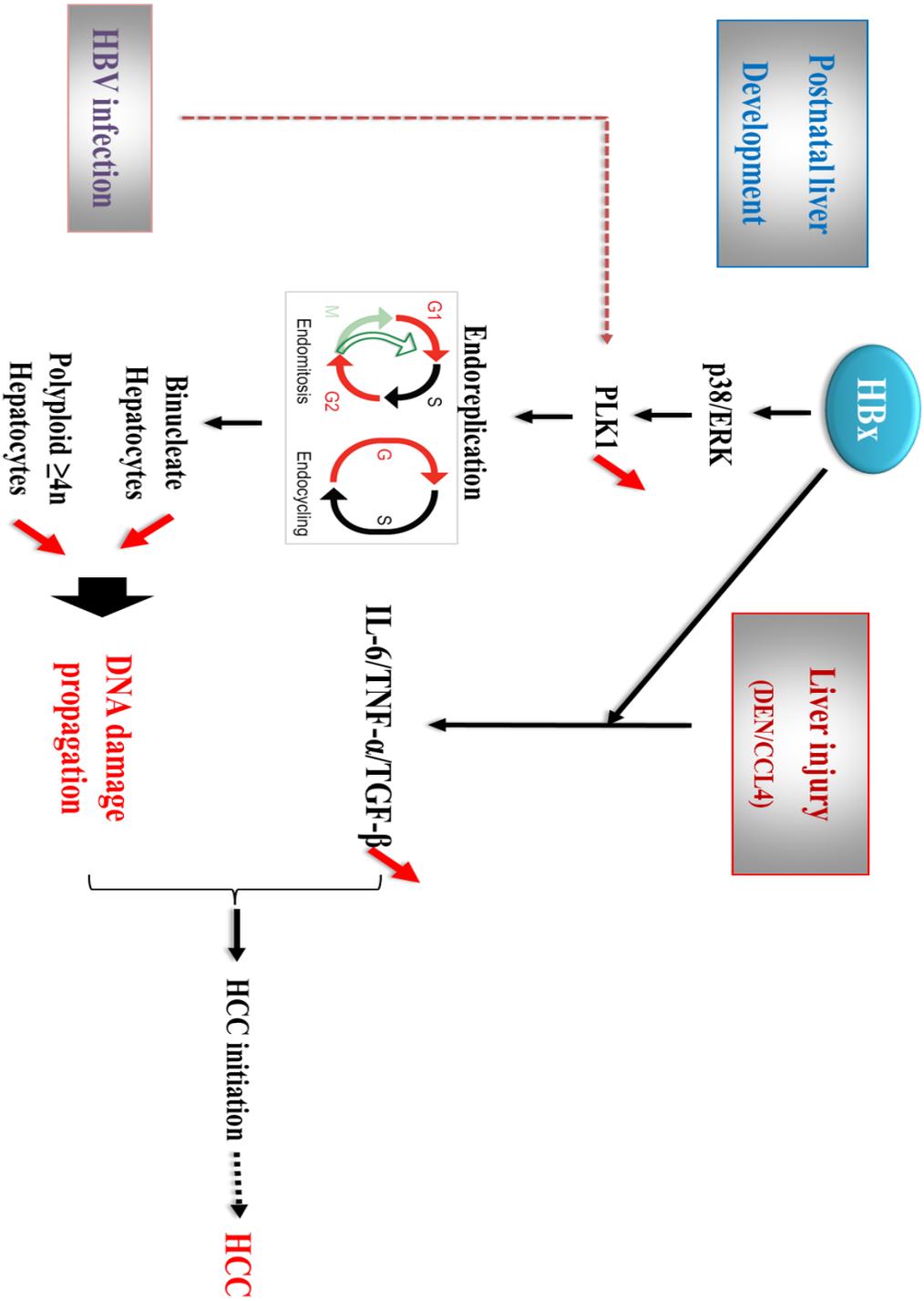
PLK1 via l'activation des voies p38 et ERK Mapk. De façon intéressante, PLK1 a été récemment rapporté comme un facteur cellulaire participant à la réplication du VHB (Diab et al. 2017). La stimulation de la réplication du VHB par PLK1 pourrait-il participer à l'augmentation de l'expression de la protéine FL-HBx promoteur d'une polyploïdie pathologique ? De plus, nos travaux ont mis en évidence que la polyploïdisation pathologique participe au développement du CHC mais l'évolution des hépatocytes génétiquement instables vers un phénotype d'hépatocytes initiés voire transformés nécessite un microenvironnement inflammatoire (IL-6, TNF- α , TGF- β). Ainsi, la capacité de la protéine FL-HBx à potentialiser la polyploïdisation pathologique et l'inflammation donne un avantage sélectif aux hépatocytes exprimant la protéine FL-HBx dans l'acquisition d'un phénotype initié ou transformé (voir figure mécanisme proposé).

En perspectives, l'expression plus élevée de marqueurs de cellules progénitrices tumorales en présence de la protéine FL-HBx peut être liée au fait que cette protéine virale, en induisant une polyploïdie pathologique des hépatocytes, favorise l'amplification de séquences géniques codant pour des oncogènes et/ou des voies activant des oncogènes ou inhibant les facteurs suppresseurs de tumeur au cours du développement et de la maladie du foie. Il serait donc intéressant de déterminer l'existence éventuelle d'une corrélation stricte entre les changements de ploïdie et l'expression de marqueurs de cellules progénitrices tumorales, en évaluant :

- Dans un 1^{er} temps, la présence et le niveau d'instabilité génétique/chromosomique (aneuploïdie) dans les différentes classes polyploïdes (2N, 4N et \geq 8N) par une approche de CGH array (« Comparative genomic hybridation »).
- Ensuite, parmi les différentes classes polyploïdes, celle qui exprime ces marqueurs de cellules initiées par phénotypage au FACs ou par une approche de tri cellulaire couplé à de la RNAseq (séquençage des ARN).
- Enfin, l'existence d'une corrélation entre le degré d'instabilité génétique/chromosomique et l'expression de marqueurs de progéniteur tumoral.

Pour démontrer la capacité de ces hépatocytes initiés à évoluer en CHC, il faudrait isoler par perfusion à la collagénase, la classe d'hépatocytes polyploïdes identifiée précédemment et de la transplanter dans les souris uPA dont le foie présente des stimuli de prolifération continue et de suivre l'apparition et le développement des nodules tumoraux par PET-scan (« Positron emission tomography ») ou IRM. En parallèle, il faudrait utiliser la même approche pour démontrer que les autres classes d'hépatocytes présentent un risque moindre d'évolution en

Mécanisme proposé



cellules tumorales. De plus, afin de caractériser et de valider la contribution de la polyplœdie pathologique au développement du CHC, il serait intéressant de comparer l'incidence et le nombre de nodules tumoraux dans les souris uPA transplantées avec des hépatocytes polyplœides (4N et 8N) par rapport aux diploïdes (2N) isolés de foie de la même souris (Tg FL-HBx ou sauvage) après traitement DEN ou CCL4. Suite à cela, comparer le potentiel tumorigène des différents contingents cellulaires polyplœides entre les souris Tg FL-HBx et les souris sauvages après traitement.



ANNEXES





ANNEXE 1



C-terminal-truncated hepatitis B virus X protein enhances the development of diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinogenesis

Ivan Quetier,^{1,2,3†} Nicolas Brezillon,^{1,2,3†} Julien Revaud,^{1,2,3} James Ahodantin,^{1,2,3} Lucie DaSilva,^{1,2,3} Patrick Soussan^{1,2,3,4,5} and Dina Kremsdorf^{1,2,3}

Correspondence

Dina Kremsdorf
dina.kremsdorf@inserm.fr

¹Inserm, U845, Team 'Pathogénèse des hépatites virales B et immunothérapie', Paris, France

²Université Paris Descartes, Sorbonne Paris-Cité, Faculté de Médecine Necker, Paris, France

³Institut Pasteur, Département de Virologie, Paris, France

⁴Service de Virologie, Hôpital Tenon, Paris, France

⁵Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

Hepatitis B virus X protein (HBx) is involved in the development of hepatocellular carcinoma (HCC). The HBx sequence is a preferential site of integration into the human genome, leading to the formation of C-terminal-truncated HBx proteins (Ct-HBx). We previously reported that Ct-HBx proteins were able to potentiate cell transformation *in vitro*. Our present goal was to compare the ability of Ct-HBx and full-length HBx (FL-HBx) proteins to develop or enhance HCC in transgenic mice. In the absence of treatment, neither Ct-HBx- nor FL-HBx-transgenic mice developed HCC. In young mice treated with diethylnitrosamine (DEN) at 8 months of age, a significantly higher incidence and number of liver lesions were observed in Ct-HBx mice than in FL-HBx and control mice. The earlier development of tumours in Ct-HBx-transgenic mice was associated with increased liver inflammation. At 10 months, macroscopic and microscopic analyses showed that, statistically, FL-HBx mice developed more liver lesions with a larger surface area than control mice. Furthermore, during DEN-induced initiation of HCC, Ct-HBx- and FL-HBx-transgenic mice showed higher expression of IL-6, TNF- α and IL-1 β transcripts, activation of STAT3, ERK and JNK proteins and an increase in cell apoptosis. In conclusion, in DEN-treated transgenic mice, the expression of Ct-HBx protein causes a more rapid onset of HCC than does FL-HBx protein. HBV genome integration leading to the expression of a truncated form of HBx protein may therefore facilitate HCC development in chronically infected patients.

Received 1 August 2014

Accepted 12 December 2014

INTRODUCTION

Chronic hepatitis B virus (HBV) infection is a major risk factor for the development of hepatocellular carcinoma (HCC), accounting for more than 50 % of cases worldwide (Kew, 2011). The direct mechanisms whereby HBV causes malignant transformation remain elusive. Nevertheless, much of the available evidence supports a pathogenetic role of the viral HBx protein. HBx is a small protein of 17 kDa, which is highly conserved among all mammalian hepadnaviruses and is essential to the enhancement of HBV replication (Assrir *et al.*, 2010). HBx protein does not bind directly to DNA but, rather, acts on cellular promoters via protein–protein

interactions and displays pleiotropic effects on different pathways involved in intracellular signalling, transcriptional activation that modulates cell responses to genotoxic stress, protein degradation, apoptosis and cell division, which may be responsible for the potential transforming activities of HBx (for a review, see Kew, 2011). HBx is expressed at low levels during acute and chronic hepatitis and induces a humoral and cellular immune response (Malmassari *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2010). The HBx gene is maintained and transcribed in most integrated subviral DNA, and several studies have demonstrated the expression of HBx mRNA and/or protein in human HCC in the absence of any HBV replication (Toh *et al.*, 2013). Whether HBx directly contributes to the development of HBV-associated HCC or functions as a co-factor in HCC development continues

†These authors contributed equally to this work.

to be debated. Indeed, despite *in vivo* data showing that HBx-transgenic mice may directly develop HCC, it is more likely that HBx expression participates in its development by sensitizing transgenic mice to chemical carcinogens or by cooperating with cellular oncogenes (for a review, see Brechot *et al.*, 2010).

Natural mutants of HBx have been described in the liver and serum of patients with different clinical diseases and may play a role in the development of HBV-related HCC (Iavarone *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2008; Sirma *et al.*, 1999; Toh *et al.*, 2013; Tu *et al.*, 2001). These include hot-spot mutations in HBx at aa 130 and 131, which have been associated with the development of HCC (Iavarone *et al.*, 2003; Kuang *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2011). Furthermore, the random integration of HBV DNA into the host genome frequently leads to 3'-end-deleted sequences of the HBx gene and the observation of chimeric transcripts which often carry deletions at the 3'-end of HBx gene, resulting in C-terminal-truncated HBx protein (Iavarone *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2008; Sirma *et al.*, 1999; Sung *et al.*, 2012; Sze *et al.*, 2013; Toh *et al.*, 2013; Tu *et al.*, 2001). Interestingly, a recent study with human HCC samples reports an association between the presence of C-terminal truncation of HBx and venous invasion (Sze *et al.*, 2013). However, most of the data in favour of the contribution of C-truncated HBx proteins in tumorigenesis are from *in vitro* studies. We previously reported that HBx proteins with deletion of amino acids at the C-terminal region have altered capacity to control cell proliferation and transcriptional activity but were able to potentiate *ras* and *myc* cell transformation (Sirma *et al.*, 1999; Tu *et al.*, 2001). Other *in vitro* data have shown that these HBx mutants retain the ability to bind to p53 and to block p53-mediated apoptosis (Huo *et al.*, 2001). The C-terminal region of HBx is indispensable for HBx-specific localization in mitochondria, which is involved in activating several cytosolic signal transduction pathways (Shirakata & Koike, 2003). Although the extent of deletion of the 3'-end of the *hbv* gene varies, the integrity of the DDB1-binding domain (aa 76–125) probably protects HBx truncated protein from proteasome-mediated degradation (Bergametti *et al.*, 2002; Lin-Marq *et al.*, 2001). By contrast, C-terminal-truncated HBx proteins showed specific mechanisms involved in regulation of cell cycle and apoptosis (Bock *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2008b).

These *in vitro* results suggest that the HBx protein with C-terminal deletions may be implicated in the development of HCC through distinct biological functions than the full length HBx protein. Therefore, to better define the involvement of naturally occurring HBx protein mutants in the evolution of liver disease to HCC, we decided to perform an *in vivo* comparison of the carcinogenic or co-carcinogenic capacities of C-terminal-truncated HBx (Ct-HBx) and non-truncated HBx (FL-HBx) proteins obtained from tumour and non-tumour biopsies from the same patient.

RESULTS

Characterization of HBx-transgenic strains

We previously reported that, *in vitro*, HBx proteins with natural deletion at the C-terminal region had altered capacity to control cell proliferation and transcriptional activity but were able to potentiate *ras* and *myc* cell transformation and that a deletion of 16 aa was enough to observe these effects (Sirma *et al.*, 1999; Tu *et al.*, 2001). Thus, to generate HBx-transgenic mice we used a couple of tumour/non-tumour sequences (patient 1) differing only by a deletion of 18 aa of HBx and the addition of three amino acids from the cellular genome in the tumoural region (Fig. 1b) (Sirma *et al.*, 1999; Tu *et al.*, 2001).

Transgenic mice expressing FL-HBx (pX-HBx-1336 and pX-HBx-1368) or Ct-HBx (pX-HBx-1280) under HBV regulatory elements were generated (Fig. 1a). HBx transcripts were quantified using reverse transcription and quantitative PCR (RT-qPCR) and the highest expression of transcripts was observed in pX-HBx-1336 transgenic mice (Fig. 1c). Assuming an identical level of expression in each hepatocyte, the HBx RNA copy number was estimated to be 8 to 25 per hepatocyte for the 1336 lineage, 0.2 to 0.5 per hepatocyte for the 1368 lineage, and 0.07 to 0.2 per hepatocyte for the 1280 lineage. In accordance with the level of viral transcript expression, the HBx protein was detected in the two FL-HBx-transgenic mouse liver tissues but barely detected in Ct-HBx-transgenic mice (Fig. 1d). Finally, different organs in addition to the liver were investigated for the expression of HBx mRNA; a significant expression of HBx transcript was only observed in kidney by RT-qPCR (Quétier *et al.*, 2013).

Susceptibility of HBx-transgenic mice to DEN-induced hepatocarcinogenesis

At 18 months of age, no direct carcinogenesis was observed in Ct-HBx- or FL-HBx-transgenic mice (data not shown).

Thus, the DEN-induced liver tumour model was used to explore whether the Ct-HBx protein was able, like the FL-HBx protein, to participate in development of hepatocarcinogenesis (Lee *et al.*, 2004; Madden *et al.*, 2001). To exert its carcinogenic effect, DEN needs to be bioactivated in the liver by several P450 isozymes, including CYP2E1, resulting in DNA adducts formed through an alkylation mechanism (Verna *et al.*, 1996). The resulting O⁶-alkylguanine leads to GC-AT transitions, which are believed to be largely responsible for DEN-induced carcinogenesis. Exposure to DEN is also associated with hepatocellular accumulation of reactive oxygen species, which may enhance DEN-induced hepatocarcinogenesis (Santos *et al.*, 2012). Livers of Ct-HBx- and FL-HBx-transgenic mice, and genetically matched WT treated mice were removed from post-mortem mice at 8, 10 or 12 months. Macroscopically visible lesions on the liver surface, representing both pre-neoplastic focal lesions and benign or malignant neoplastic lesions were counted and microscopic analyses were

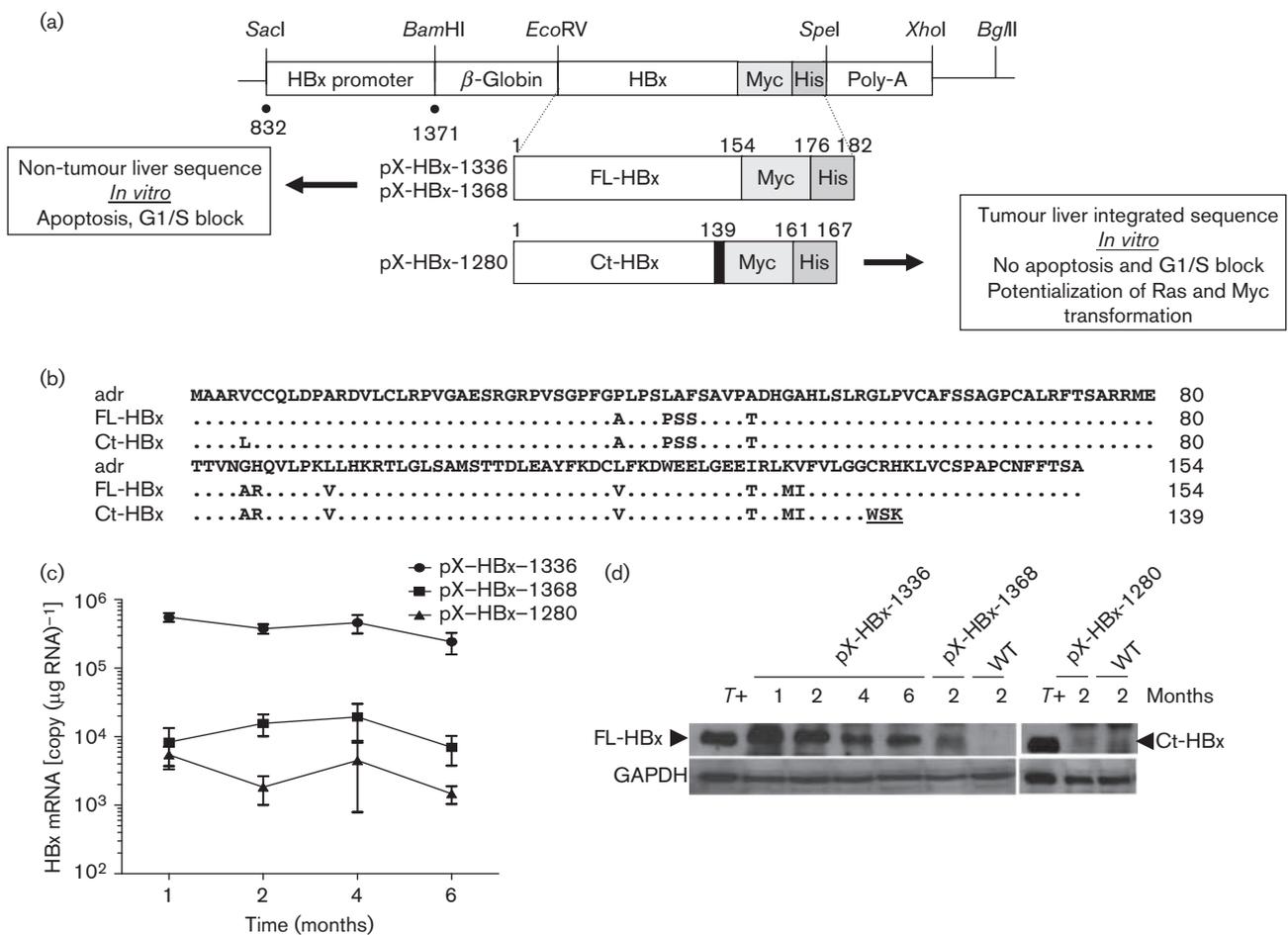


Fig. 1. Characterization of FL-HBx- and Ct-HBx-transgenic mouse strains. (a) Scheme of the transgene (numbers correspond to nucleic acid position on HBV sequence) and FL-HBx and Ct-HBx proteins (shaded boxes correspond to three amino acids belonging to the human genome). (b) Amino acid sequences of FL-HBx and Ct-HBx proteins compared with the prototype of *adr* serotype. Underlined amino acids correspond to cellular sequence. (c) HBx mRNA expression in the liver of pX-HBx-1336, pX-HBx-1368 and pX-HBx-1280 mice at 1, 2, 4 and 6 months of age ($n=3$). Error bars, \pm the standard deviation. (d) Western blot analysis of FL-HBx and Ct-HBx expression at the indicated times. The positive controls were FL-HBx-Myc-His-tag or Ct-HBx-Myc-His-tag vectors transfected into Huh7 cells. The negative control was WT mice.

performed (Figs 2 and 3). At 8 months, the incidence and the number of macroscopic liver lesions were significantly higher in Ct-HBx-transgenic mice than in FL-HBx-transgenic and control mice (Fig. 2b, e). Similarly, the microscopic evaluation of haematoxylin and eosin (H&E)-stained slides showed a higher incidence of tumours in Ct-HBx-transgenic mice than in FL-HBx-transgenic and control mice (Fig. 2b). However, probably because of the small size and number of observed lesions per slide, no statistical difference in tumour area was observed between the three groups of mice (Fig. 2e). The microscopic evaluation of H&E-stained slides showed essentially pre-neoplastic foci and areas with inflammatory cells (Fig. 3a-c). At 10 months, the incidence of macroscopic liver lesions was similar in the WT and FL-HBx-transgenic mice (Fig. 2c). However, the number of macroscopic lesions was

statistically higher in FL-HBx-transgenic mice than in WT mice (Fig. 2f). Similarly, histological assessment of the liver tumours showed a significantly higher tumour area in FL-HBx-transgenic mice than in WT mice (Fig. 2f). Histopathological examination revealed that most of the tumour nodules seen in the livers were of a neoplastic type (Fig. 3d-f). In 12-month-old FL-HBx- and Ct-HBx-transgenic animals, macroscopic and microscopic examinations did not evidence differences (Fig. 2d, g). Histopathological examination of the livers revealed enlarged cancerous tissue in a high proportion of animals, corresponding to well-differentiated HCC or multifocal nodules of poorly differentiated HCC (Fig. 3g-i).

In order to evaluate the liver damage in DEN-treated mice, blind scores for steatosis, necrosis and inflammatory cell

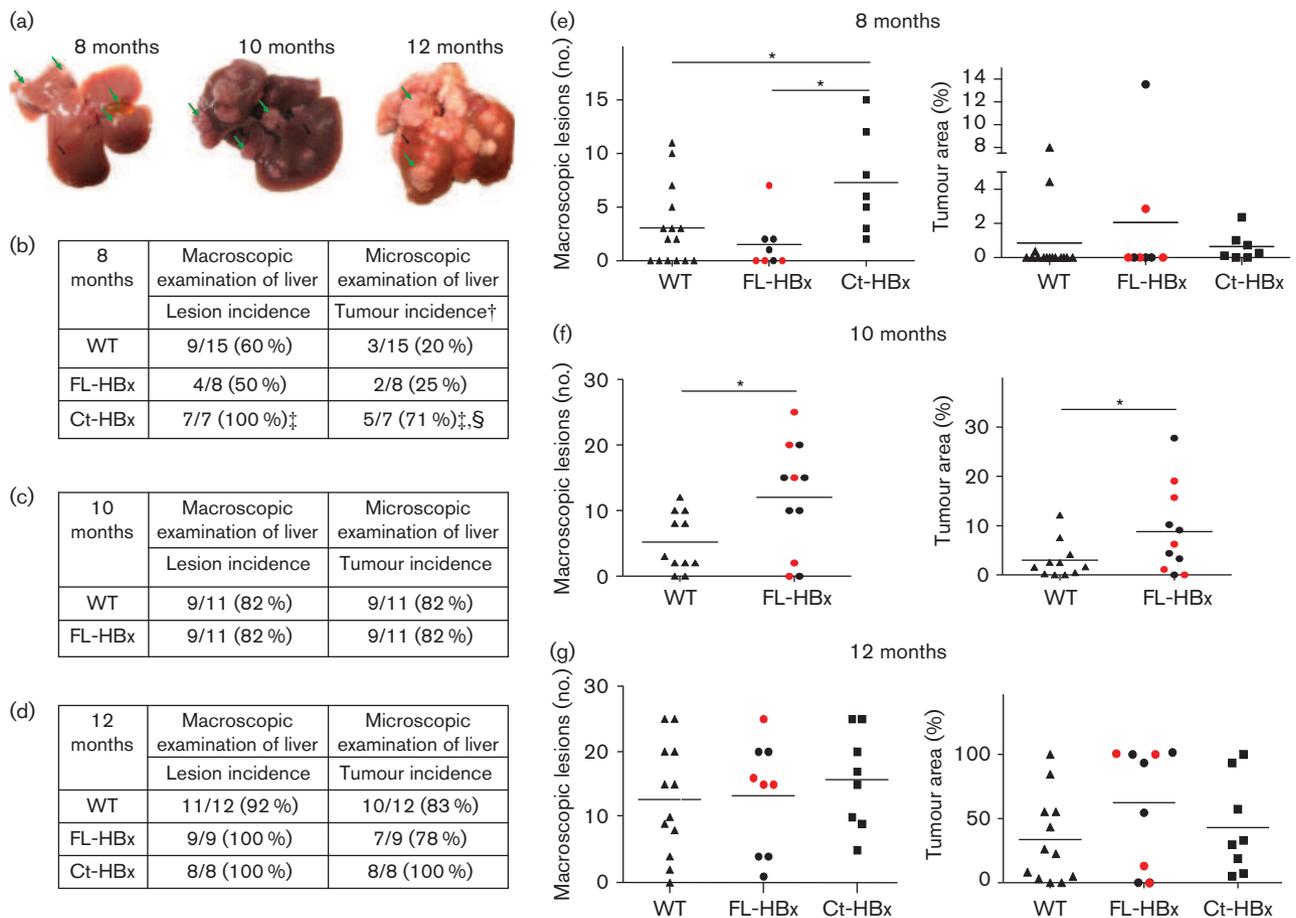


Fig. 2. Increased susceptibility of Ct-HBx- and FL-HBx-transgenic mice to DEN-induced hepatocarcinogenesis. (a) Representative photographs of livers from male WT mice, 8, 10 and 12 months after DEN treatment. Green arrows indicate lesions. Lesions on the liver surface were pre-neoplastic focal lesions and benign or malignant neoplastic lesions. (b, c, d) The incidence of macroscopic lesions and the number of microscopic tumours were determined in WT, FL-HBx and Ct-HBx livers at 8 (b), 10 (c) and 12 months (d) after DEN treatment. (e, g, f) Determination of the number of macroscopic lesions (left panels) and tumour area (right panels) in WT, FL-HBx and Ct-HBx livers at 8 (e), 10 (f) and 12 months (g) after DEN treatment. †HCC in at least one of the three liver sections analysed. ‡,§, Significant χ^2 -test analysis between Ct-HBx mice and WT or FL-HBx mice, respectively. *, Significant Student's *t*-test analysis. For FL-HBx-transgenic mice, black circles correspond to the pX-HBx-1368 strain and red circles to the pX-HBx-1336 strain. nb, number.

infiltration were determined (Fig. 4). In 8-month-old Ct-HBx-transgenic mice, but not in FL-HBx-transgenic mice and control mice, significant increase in inflammation was observed (Fig. 4d). Indeed, scattered small inflammatory cells in the lobule, associated or not with portal inflammation, were observed in all of the Ct-HBx-transgenic mice (data not shown). In 10-month-old FL-HBx-transgenic and control mice, no differences were seen with respect to hepatic damage (Fig. 4e).

Overall, in this model of DEN-induced carcinogenesis, our findings are in favour of a co-carcinogenic role for FL-HBx and Ct-HBx proteins, the effect of the latter occurring earlier. Furthermore, the earlier development of tumours in Ct-HBx-transgenic mice was associated with increased liver inflammation.

Effect of HBx expression on DEN-induced initiation of carcinogenesis

The next step was to determine whether FL-HBx- and Ct-HBx-transgenic mice were more sensitive to DEN-induced acute hepatic injury. In adult mice, DEN acts only as an initiator of liver injury. This is possibly associated with the lesser capacity of hepatocytes to proliferate in adult liver. Indeed, hepatocyte proliferation is needed for complete DEN-induced carcinogenesis (Maeda *et al.*, 2005). Thus, cell death and compensatory proliferation were investigated in 2-month-old mice injected with a high dose of DEN [100 mg (kg body mass)⁻¹].

To quantify cell death, TUNEL assays were performed on liver sections 48 h after the DEN injection. Ct-HBx- and

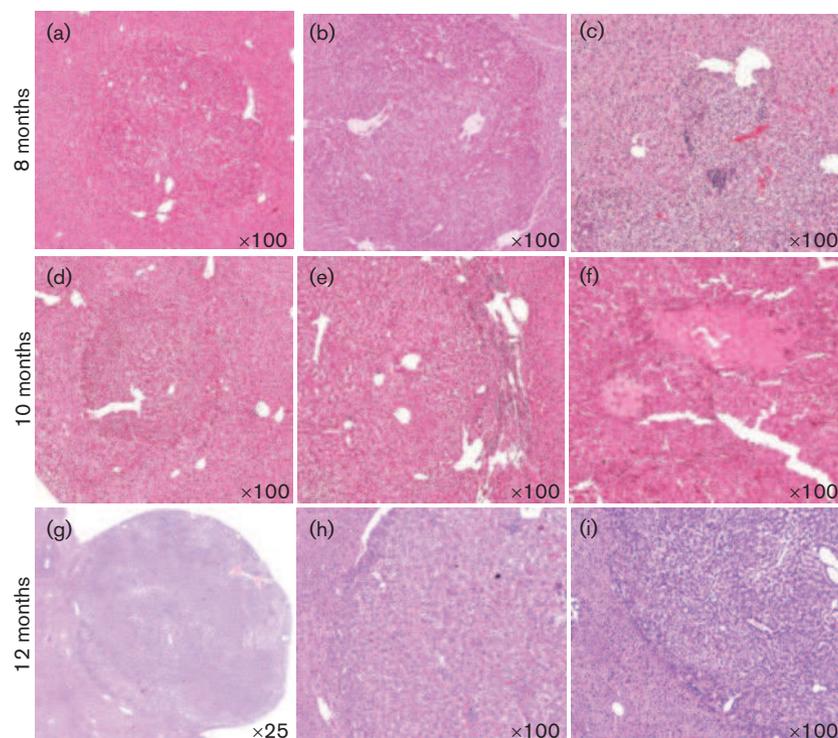


Fig. 3. Representative H&E staining of liver sections from 8- and 12-month-old DEN-treated male mice. (a, b, c) Liver sections after 8 months of DEN treatment: (a) adenoma, (b) small tumour surrounded by normal liver parenchyma, (c) area with an infiltrate of inflammatory cells. (d, e, f) Liver sections 10 months after DEN treatment: (d) adenoma containing eosinophilic material at the periphery; (e) HCC tumour arranged in multiple cell layers with an infiltrate of inflammatory cells that appeared to concentrate around the portal triads; (f) necrotic area surrounded and infiltrated by inflammatory cells. (g, h, i) Twelve months after exposure to DEN, examination revealed the formation of a large adenoma (g) and well-differentiated (h) or poorly differentiated (i) HCCs.

FL-HBx-transgenic mice displayed a significantly larger labelled area than WT mice (Fig. 5a). The highest rate of hepatocyte apoptosis (with a twofold increase) was observed in Ct-HBx-transgenic mice (Fig. 5b). At the same time, compensatory cell proliferation was measured by Ki-67 labelling of nuclei (Fig. 5a,c). At this short time after DEN treatment, in agreement with previous data (Schneider *et al.*, 2012), proliferation was essentially observed in non-parenchymal cells. Despite a higher degree of cell proliferation in Ct-HBx-transgenic mice than in either FL-HBx-transgenic or WT mice, no statistical difference was observed (Fig. 5c). As, *in vitro*, this specific Ct-HBx protein had lost its cytotoxic activity (Tu *et al.*, 2001), we wanted to investigate if the observed higher increase of apoptosis in Ct-HBx-transgenic mice might be associated with a sensitization of cells to TNF-induced apoptosis. For that, we used the model of fulminant hepatitis induced by TNF- α and D-galactosamine treatment and evaluated the survival of FL-HBx- and Ct-HBx-transgenic mice (Fig. 5d). Interestingly, Ct-HBx-transgenic mice were significantly more sensitive to TNF- α and D-galactosamine-induced fulminant hepatitis.

The inflammatory process that occurred soon after DEN injection is a factor involved in hepatocarcinogenesis. We therefore decided to analyse the expression of IL-6, TNF- α , IL-1 β and TGF β transcripts, using RT-qPCR, 4 h after DEN treatment. An increased induction of IL-6, TNF- α and IL-1 β in FL-HBx and Ct-HBx mice was observed compared with the control mice (Fig. 5e). The expression of TGF β (which is mostly involved in the development of fibrosis) was not affected by DEN treatment (Fig. 5e). Activation of signalling pathways controlled by IL-6 and

TNF- α , namely STAT3, JNK and ERK1/2, was also analysed (Fig. 5f). Four hours after DEN treatment, we observed an increase in the phosphorylation of JNK, ERK1/2 and STAT3 in both Ct-HBx- and FL-HBx-transgenic mice compared with the livers of WT mice (Fig. 5f). In untreated animals, expression of transcripts and proteins was unchanged. Interestingly, activation of ERK1/2 was higher in Ct-HBx mice than in FL-HBx mice. Finally, 48 h post treatment, we did not observe major modifications in expression of mRNAs and proteins in liver of HBx-transgenic mice compared with control (data not shown).

These observations suggested that the inflammatory and apoptosis responses related to DEN administration are enhanced in HBx-transgenic mice and confirmed the role of FL-HBx and Ct-HBx proteins in the modulation of hepatocyte metabolism, which could contribute to the induction of tumours following treatment with DEN.

Activation of signalling pathways in the livers of DEN-treated mice

In order to investigate whether Ct-HBx or FL-HBx protein modified inflammatory or oncogenic pathways in DEN-treated transgenic mice at 8 and 12 months, liver biopsies were analysed by Western blot (Fig. 6a). It should be noted that at 8 months lesions were very small, with only pre-neoplastic tumours (Fig. 2a), rendering difficult to obtain biopsies with only preneoplastic tissues. In contrast, for biopsies obtained at 12 months, most of the liver tissues contained HCC tumours (Fig. 2a). In addition, HBx mRNA expression was investigated in DEN-treated or untreated

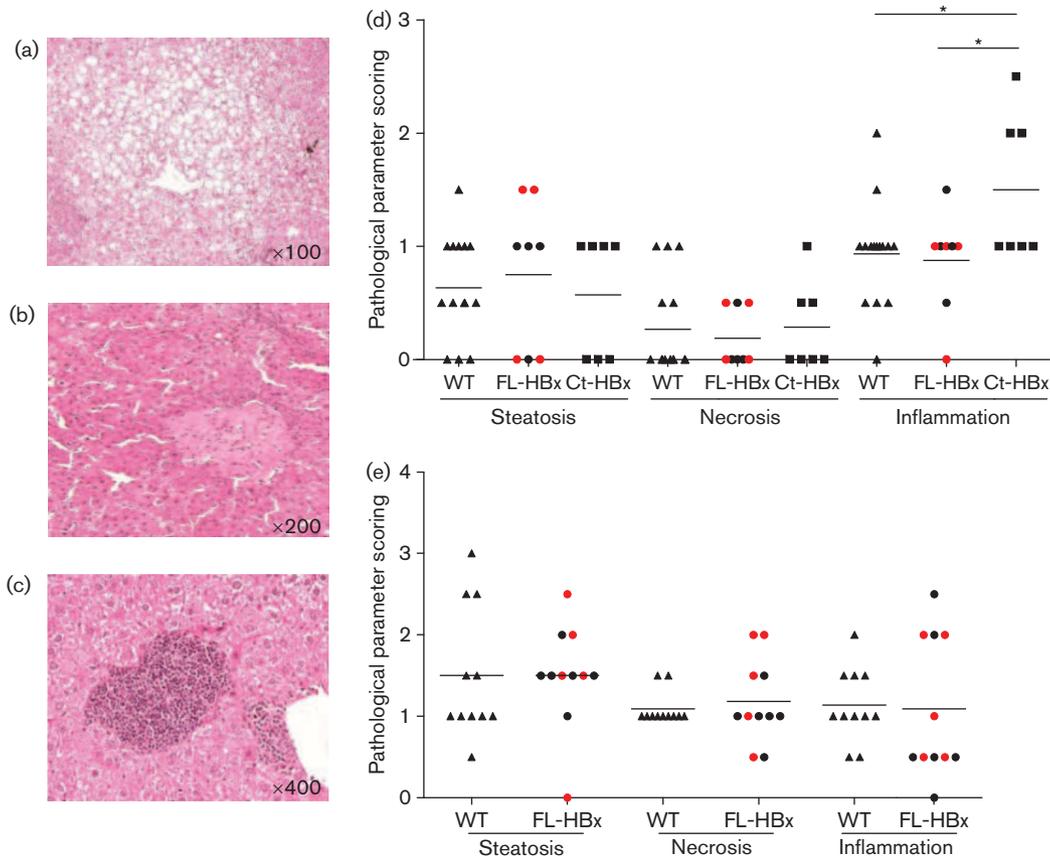


Fig. 4. Pathological anatomy analysis of livers from Ct-HBx- and FL-HBx-transgenic mice after DEN-induced hepatocarcinogenesis. (a, b, c) Illustration of liver steatosis (a), hepatocyte necrosis (b) and inflammatory infiltrate (c) observed in 8-month-old DEN-injected WT mice. Livers sections were stained with H&E. (d, e) Steatosis, necrosis and inflammation in WT, FL-HBx and Ct-HBx liver sections were scored, as indicated in Methods, at 8 (d) and 10 months (e) after DEN injection. *, Significant Student's *t*-test analysis. For FL-HBx-transgenic mice, black circles correspond to the pX-HBx-1368 strain and red circles to the pX-HBx-1336 strain.

FL-HBx- and Ct-HBx-transgenic mice at 8 and 12 months; DEN treatment did not modify HBx mRNA expression (Fig. 6c).

The activation of STAT3, JNK and ERK, which is frequently observed in a context of HCC, was investigated. Surprisingly, we did not observe any STAT3 activation at either 8 or 12 months in any of the mice. Activation of the stress-related JNK pathway was observed between 8 and 12 months in WT mice, and was more pronounced between 8 and 12 months in Ct-HBx- and FL-HBx-transgenic mice. Finally, the ERK pro-proliferative pathway was markedly activated in the livers of Ct-HBx- and FL-HBx-transgenic mice at 12 months of age compared with the WT mice livers. We also investigated the level of expression of the alpha fetal protein (AFP), re-expressed in the majority of HCCs. AFP was highly expressed in treated mice at 12 months, and more specifically in HBx-transgenic mice. In addition, in agreement with compensatory liver cell proliferation driving carcinogenesis in liver, proliferation cell nuclear antigen (PCNA), a marker of cell proliferation, was

highly expressed in treated mice at 12 months, independently of the mouse genotype (Fig. 6a). To evaluate the impact of HBx expression in the absence of DEN treatment, we investigated the expression of ERK and PCNA in biopsies from untreated transgenic and control mice at 12 months (Fig. 6b). In contrast to ERK activation in DEN-treated Ct-HBx- and FL-HBx-transgenic mice 12 months after treatment, no difference was observed in untreated mice at this time. Interestingly, in Ct-HBx-transgenic mice at 12 months PCNA expression seemed to be increased. This difference was not observed in treated animals.

Thus, after DEN treatment, pathways involved in cell proliferation and HCC development were upregulated in livers of Ct-HBx- and FL-HBx-transgenic mice.

DISCUSSION

Recent studies using next-generation sequencing technologies have highlighted the fact that, following the integration

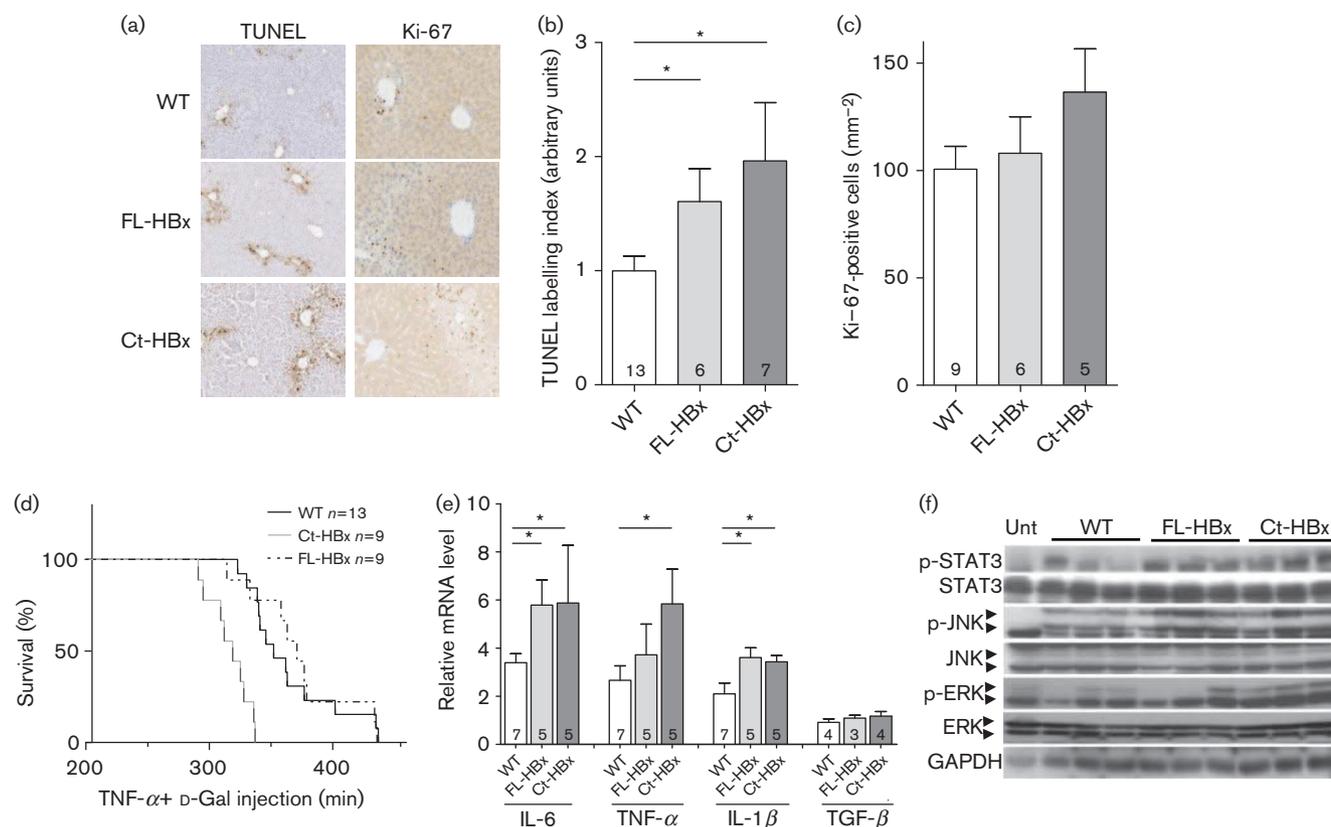


Fig. 5. Increased susceptibility of FL-HBx- and Ct-HBx-transgenic mice to the DEN-induced initiation phase of liver carcinogenesis. To induce acute liver lesions, 2-month-old WT, FL-HBx (strain pX-HBx-1336) and Ct-HBx mice were treated with DEN [$100 \mu\text{g} (\text{g body mass})^{-1}$] and euthanized 4 or 48 h later. (a) Representative TUNEL and Ki-67 staining of liver sections from WT, FL-HBx and Ct-HBx mice 48 h after DEN injection. (b, c) Quantification of apoptosis (b) and cell proliferation (c) is shown in livers from WT, FL-HBx and Ct-HBx mice 48 h after DEN injection. (d) Survival analysis of WT, FL-HBx and Ct-HBx mice after induction of fulminant hepatitis. Comparisons of survival curves were performed using the log-rank (Mantel-Cox) test ($P=0.0001$). (e) Relative mRNA expression of IL-6, TNF- α , IL-1 β and TGF- β in livers from WT, FL-HBx and Ct-HBx mice 4 h after DEN injection. (f) Western blot analysis of STAT3, JNK and ERK activation in livers from WT, FL-HBx and Ct-HBx mice, 4 h after DEN injection. Each lane represents a single mouse. Lanes labelled 'Unt' refer to an untreated WT animal. (b, c, e) Values represent mean \pm SE. *, $P<0.05$ compared with the corresponding WT groups determined using Student's *t*-test. The number inside each bar indicates the number of mice.

of HBV into the cellular genome, the 3'-end of the HBx gene is often deleted and this event is observed more frequently in tumour tissues (Jiang *et al.*, 2012; Sung *et al.*, 2012; Toh *et al.*, 2013). Furthermore, truncated HBx human chimeric transcripts may be seen and expressed as chimeric proteins (Sirma *et al.*, 1999; Toh *et al.*, 2013; Tu *et al.*, 2001). This has raised the question of a putative role for Ct-HBx proteins in the development of HCC. Our study was carried out in order to enable *in vivo* investigation of the oncogenic potential of Ct-HBx in comparison with FL-HBx protein.

First of all, we observed that, in the absence of any treatment, neither FL-HBx- nor Ct-HBx-transgenic mice developed HCC, as evaluated by macroscopic and microscopic analyses performed during an 18 month follow-up. The data available on the ability of FL-HBx protein to

induce carcinogenesis directly are contradictory. Indeed, although few FL-HBx-transgenic mice strains might develop spontaneous HCC, there is more evidence that FL-HBx protein participates in HCC development by sensitizing the animals to carcinogen inducers. The genetic background of the mice and the level of expression or genotype of HBx protein may explain these discrepancies (Kremsdorf *et al.*, 2006).

To evaluate, in our model, where FL-HBx and Ct-HBx were expressed under their own promoter, whether FL-HBx or Ct-HBx proteins were involved in liver carcinogenesis, DEN-induced HCC treatment was chosen because of its relevance to human HCC gene induction. Indeed, when injected into young animals, the gene expression patterns of HCC induced by DEN in mice were generally similar to those seen in the poorer survival group of human HCC

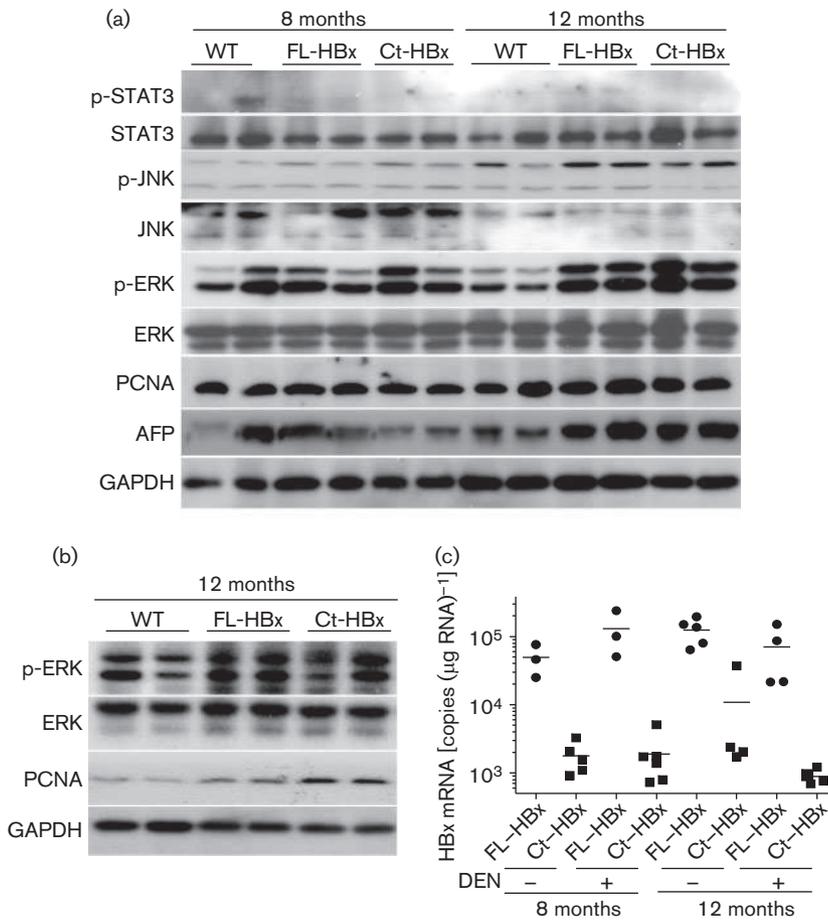


Fig. 6. Analysis of the modulation of pathways activated during DEN-induced liver carcinogenesis in FL-HBx- and Ct-HBx-transgenic mice. Ten-day-old WT, FL-HBx and Ct-HBx mice were injected with DEN [2 µg (g body mass)⁻¹]. (a) Western blot analysis of STAT3, JNK and ERK activation, and PCNA and AFP expression, 8 and 12 months after treatment. (b) Western blot analysis of ERK activation and PCNA expression in 12 month untreated FL-HBx and Ct-HBx mice. Each lane represents a single mouse. (c) HBx mRNA expression in the liver of FL-HBx- (pX-HBx-1336) and Ct-HBx- (pX-HBx-1280) transgenic mice, treated or not treated with DEN, at 8 and 12 months of age.

(Lee *et al.*, 2004). Our findings were in favour of an accelerated development of liver tumours in Ct-HBx- and FL-HBx-transgenic mice as compared with WT mice. Indeed, in Ct-HBx-transgenic mice, 8 months after DEN treatment, livers displayed a higher macroscopic and microscopic incidence of tumours, associated with an increase in liver inflammation, whereas in FL-HBx-transgenic mice increases in the number of tumours and in tumour area versus WT mice were only observed 10 months after DEN treatment. To our knowledge, this study provides the first indication under *in vivo* conditions of the ability of the Ct-HBx mutant not only to induce HCC but to do it more rapidly than FL-HBx. This emphasizes that the HBx deletion mutant may develop distinct biological properties that contribute to liver carcinogenesis. Initial *in vitro* data demonstrated the ability of the Ct-HBx protein to abrogate the growth-suppressive and apoptotic effects of FL-HBx protein (Huo *et al.*, 2001; Sirma *et al.*, 1999; Tu *et al.*, 2001) and that Ct-HBx might enhance cell proliferation (Jiang *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2008b; Ma *et al.*, 2008). The Ct-HBx protein has also been reported to modulate microRNA expression (Fu *et al.*, 2012; Yip *et al.*, 2011), to regulate Wnt-5a expression (Liu *et al.*, 2008a) and to play a role in cell invasiveness by enhancing the transcription of metalloproteinase 10 (MMP10) through c-Jun (Sze *et al.*, 2013).

DEN-induced carcinogenesis promotion requires the proliferation of hepatocytes; thus in adults, where mature hepatocytes display an extremely low turnover rate, DEN administration induces only the initiation stage, without tumour development. Our experiments revealed that during the DEN-induced initiation stage, there was an increase in the sensitization of both FL-HBx- and Ct-HBx-transgenic mice to liver injury. Interestingly, a more pronounced apoptosis was observed in Ct-HBx-transgenic mice. We have evidenced that this might be linked to a higher sensitivity of Ct-HBx-transgenic mice to TNF- α -induced apoptosis. These observations are in accordance with previous data demonstrating that the severity of acute hepatic injuries correlates with the level of cell proliferation and the development of liver tumours during the promotion stages (Lee *et al.*, 2004; Maeda *et al.*, 2005). For this reason, the increased inflammatory response and apoptosis observed in FL-HBx- and Ct-HBx-transgenic mice during the initiation phase of DEN-induced carcinogenesis might have been related to the more rapid onset and development of DEN-induced HCC, particularly in Ct-HBx-transgenic mice. We also observed, at early stages of DEN induction, an increase in cell proliferation in the livers of Ct-HBx-transgenic mice, but not in those of FL-HBx-transgenic mice, compared with WT mice. In a previous study, increased hepatocellular

proliferation in transgenic mice expressing a full-length HBx gene was observed 48 h after the injection of DEN into 12-day-old mice (Madden *et al.*, 2001). The use of different experimental protocols (newborn versus adult animals) probably reflects the differences in the results obtained. However, in line with our data, in the same study, at 8 months of age, no measurable effect of HBx protein expression on hepatocyte proliferation was evidenced (Madden *et al.*, 2001). Taken together, this indicates that the involvement of HBx protein in the induction of cell proliferation probably occurs during the early stages of DEN-induced carcinogenesis. Furthermore, the greater capacity of Ct-HBx protein to induce cell proliferation may account for the more rapid tumour development observed during the promotion stage of DEN-induced carcinogenesis.

During the initiation stage of DEN-induced carcinogenesis we observed an increased activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs: JNK and ERK) and STAT3 pathways in both transgenic mice compared with WT mice. DEN treatment leads to an accumulation of reactive oxygen species inducing the activation of JNK and STAT3, which are both involved in liver carcinogenesis (He *et al.*, 2010). Two *in vitro* studies demonstrated the ability of FL-HBx but not CT-HBx to induce the generation of reactive oxygen species, leading to the activation of STAT3 (Jung & Kim, 2013; Waris *et al.*, 2001). This suggests that, in our model, the increased activation of JNK and STAT3 by HBx proteins was probably independent of the accumulation of reactive oxygen species. Alternatively, JNK may be activated by diverse stimuli, including cytokines such as IL-1 and TNF- α (Seki *et al.*, 2012). It could therefore be hypothesized that the observed increase in IL-1 β and TNF- α transcripts might account for JNK activation. Furthermore, in a hepatoma cell line, it has been reported that HBx protein potentiated the phosphorylation of JNK by interacting with Jab1 (Tanaka *et al.*, 2006). Along the same line of evidence, we have observed increased expression of IL-6 in both transgenic mice. Interestingly, in addition to DEN induction of IL-6 production in Kupffer cells (Naugler *et al.*, 2007), HBx stimulates the production of IL-6 in a MyD88-dependent manner in hepatoma cells (Xiang *et al.*, 2011).

Interestingly, it has been reported that HBx protein may upregulate FoxM1 expression through the ERK/CREB pathway, and that FoxM1 overexpression indicated a poor prognosis in HBV-related HCC patients (Xia *et al.*, 2012). Surprisingly, whereas the IL-6/STAT3 pathway is clearly upregulated during the DEN-induced initiation phase of HCC in HBx-transgenic mice, STAT3 activation was barely detectable 8 or 12 months after DEN-induced carcinogenesis in our animals.

Considering activation of MAPKs, it was reported that, *in vivo*, the prolonged activation of ERK by HBx expression is also accompanied by the activation of JNKs (Nijhara *et al.*, 2001). Furthermore, it was identified that the internal region (aa 58–140) of HBx was as effective as the FL-HBx

in activating MAPKs (Nijhara *et al.*, 2001). Our observations that the ERK and JNK pathways are simultaneously activated by HBx demonstrate that activation of both signalling pathways is required to trigger a full spectrum of phenotypic traits associated with oncogenesis in HBx-expressing livers. This reinforces the idea that HBx may be involved in HBV-mediated liver carcinogenesis through pro-proliferation mechanisms. Consistent with these findings, in our study the ERK and JNK pathways in the livers of both transgenic mice, 8 and 12 months after DEN treatment, were upregulated compared with WT mice. In addition, we showed that AFP, an important biomarker of HCC, was highly expressed in treated transgenic mice at 12 months. It was demonstrated that HBx derepresses AFP expression through its interaction with p53 and that the expression of AFP receptor was a pivotal event for HBx inducing malignant transformation of liver cells (Li *et al.*, 2013; Ogden *et al.*, 2000).

The mechanisms underlying liver carcinogenesis involve numerous steps during which both the immune system and viral proteins may be responsible for initiating environmental and biological modifications that lead to the development of HCC. Among them, it is important to mention that abnormal activation of AFP, ERK and JNK is often observed in human HCC (Min *et al.*, 2011; Seki *et al.*, 2012). The HBx protein, by modulating these pathways, might contribute to the development of HCC. Our study showed that the expression of Ct-HBx protein led to a more rapid onset of HCC than did FL-HBx protein. It could be assumed that the expression of truncated forms of HBx may facilitate cell transformation by accelerating the initiation step of carcinogenesis. This suggests that the integration of HBV into the host genome in addition to *cis*-acting effects may exert *trans*-acting effects via the expression of truncated HBx proteins and thus contribute to tumorigenesis.

METHODS

Transgenic mice. Two sequences of the HBx gene isolated from either a non-tumour (FL-HBx) or tumour (Ct-HBx) region in the same patient were used to generate transgenic mice (Tu *et al.*, 2001). HBx sequences containing the Myc-His tag were cloned downstream of the HBx promoter and enhancer I region (nt-832–1371) and β -globin intronic sequences (Fig. 1). Three independent lines were derived from the founders (pX-HBx-1336 and pX-HBx-1368 expressing FL-HBx, and pX-HBx-1280 expressing Ct-HBx), and expanded by back-crossing with the C57BL/6J strain (Institut Clinique de la Souris, Strasbourg, France). All the experiments were performed on heterozygous transgenic mice. The animals were treated in accordance with European Union regulations on animal care (directive 86/609/EEC).

Animal experiments. For the direct carcinogenic study, untreated FL-HBx, Ct-HBx and WT mice from the same litter were followed for 8, 12 and 18 months. For the co-carcinogenesis study, diethyl nitrosamine (DEN) was injected intraperitoneally at 2 μ g (g body mass)⁻¹ into 10-day-old male mice. The mice were euthanized 8, 10 and 12 months after DEN injection. At the time of sacrifice, macroscopic lesions were counted on the surface of the liver. In

order to induce acute liver damage, DEN was injected intraperitoneally at $100 \mu\text{g}$ (g body mass) $^{-1}$ into 2-month-old male FL-HBx, Ct-HBx (pX-HBx-1336 strain) and WT mice. The mice were euthanized 4 or 48 h post-injection. The left lobe of the liver was fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin for histological analysis. The remaining liver was frozen for protein or RNA analysis. For survival experiments, animals were fasted for 14 h and fulminant hepatitis was induced by intraperitoneal injection of murine TNF- α ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$; AbCys) and D-galactosamine (700 mg kg^{-1} ; Sigma). The experimental protocols were approved by the French Committee on the Ethics of Animal Experiments (MESR no. 0079303).

Histological analysis. From each mouse, three liver sections $4 \mu\text{m}$ thick, each separated by $200 \mu\text{m}$, were stained with H&E and used for histological analysis. Liver sections were digitized (Hamamatsu Nanozoomer) and analysed with NDP.VIEW software. For each mouse, the three liver sections were used to determine mean tumour number and area per slide, and blind-scored (0 to 4) (two investigators) for steatosis, necrosis and inflammation using a modified scoring scale (Brandon-Warner *et al.*, 2012). This score was representative of the mean of the three sections from each mouse.

Cell proliferation and apoptosis. Cell proliferation analysis was performed by immunohistochemistry using Ki-67 antibody (clone NCL-Ki67p; Novocastra). The number of positive nuclei was evaluated in 15 defined areas representing about 10% of the whole liver section and reported as the number of positive cells (mm liver) $^{-2}$.

To study apoptosis, TUNEL staining was performed using the *In situ* Cell Death Detection kit (Roche). After digitizing the slides, TUNEL labelling was quantified using Image-J software. TUNEL brown labelling and the counter-staining were separated using threshold tools and the percentage labelled area in the whole liver section was determined. For each experiment, the mean TUNEL-positive area found in WT mice was set at 1, and the TUNEL area was expressed in relative units.

Western blotting. Total proteins were extracted from frozen liver tissues as previously described (Quétier *et al.*, 2013). For HBx protein detection, a total of $200 \mu\text{g}$ liver protein and $10 \mu\text{g}$ HBx-myc-transfected Huh7 protein (positive control) was loaded onto 12% SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane. The membranes were incubated with c-Myc antibody (1:100) (sc-40; SantaCruz). For cellular protein detection, $20 \mu\text{g}$ protein extract was resolved on SDS-PAGE (10%) and transferred onto a nitrocellulose membrane, which was then incubated with the following primary antibodies (1:1000) in PBS-BSA (5%): GAPDH (SantaCruz), PCNA (M0879; Dako), phospho-STAT3 (no. 9131), STAT3 (no. 9132), phospho-ERK1/2 (no. 9101), ERK (no. 9102), phospho-JNK (no. 9251), JNK (no. 9258) and AFP (no. 3903) (Cell Signaling). The secondary antibody was anti-rabbit antibody coupled to horseradish peroxidase, and the bands were revealed using the ECL Plus (Amersham) or ECL Prime (Invitrogen) detection systems.

RNA quantification. Total RNA was extracted from frozen liver tissues (Qiagen kit) and quantified using Nanodrop; $1.5 \mu\text{g}$ RNA was used for reverse transcription with random primers and SuperScript II (Invitrogen). Quantification of cDNAs was performed on a Taqman 7500 (Applied Biosystems) using either the TaqMan Master Mix (Applied Biosystems) and primers/probes specific to IL-6, TNF- α , IL-1 β and TGF- β (Integrated DNA Technology), or the SybrGreen PCR Master Mix for GAPDH (forward, 5'-AGACGGCCGCATCTTCTTGTGCA; reverse, 5'-GCCCAATACGGCCAAATCCGTTC). To analyse real-time PCR data, the comparative C_T method ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) was used (Schmittgen & Livak, 2008). Data were normalized using GAPDH and expressed as the relative mRNA level compared with untreated control animals. HBx mRNA expression was quantified using Lightcycler DNA

MasterMix Sybr Green I (Roche) and specific HBx primers (forward, 5'-GCGTCCCTTTGTCTACGTCCCGTC; reverse, 5'-GCGGAAGTATGCCTCAAGGTCGG). A standard curve was included to quantify HBx mRNA as copy number (μg total RNA) $^{-1}$.

Statistical analysis. Statistical analyses were performed by using the non-parametric Mann-Whitney U-test, Student's *t*-test or χ^2 -test to compare the different groups. A *P*-value <0.05 was considered to reveal a significant difference. Comparisons of survival curves were performed using the log-rank (Mantel-Cox) test. All calculations were performed using GraphPad Prism software.

ACKNOWLEDGEMENTS

I. Q. was supported by a grant from the French Ministry for Higher Education and Research (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche). N. B. and L. D. received grant support from the Bill and Melinda Gates Foundation. J. A. received grant support from the Fondation de la Recherche Médicale (FRM). The study was supported by grants from the Institut Nationale de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Association de la Recherche contre le Cancer (ARC) (5054) and Association Nationale de Recherche sur le sida et les hépatites virales (ANRS) (06202). The authors thank Professors B. Terris and J.-C. Fournet for their assistance with the histological interpretation and discussions, S. Berissi and N. Gadessaud from the U845 histological platform for tissue processing and slide coloration, and Professor F. Pagès, F. Marliot and N. Haicheur for access to the HEGP immunomonitoring platform.

REFERENCES

- Assrir, N., Soussan, P., Kremsdorf, D. & Rossignol, J. M. (2010). Role of the hepatitis B virus proteins in pro- and anti-apoptotic processes. *Front Biosci* **15**, 12–24.
- Bergametti, F., Sitterlin, D. & Transy, C. (2002). Turnover of hepatitis B virus X protein is regulated by damaged DNA-binding complex. *J Virol* **76**, 6495–6501.
- Bock, C. T., Toan, N. L., Koeberlein, B., Song, L. H., Chin, R., Zentgraf, H., Kandolf, R. & Torresi, J. (2008). Subcellular mislocalization of mutant hepatitis B X proteins contributes to modulation of STAT/SOCS signaling in hepatocellular carcinoma. *Intervirology* **51**, 432–443.
- Brandon-Warner, E., Walling, T. L., Schrum, L. W. & McKillop, I. H. (2012). Chronic ethanol feeding accelerates hepatocellular carcinoma progression in a sex-dependent manner in a mouse model of hepatocarcinogenesis. *Alcohol Clin Exp Res* **36**, 641–653.
- Brechot, C., Kremsdorf, D., Soussan, P., Pineau, P., Dejean, A., Paterlini-Brechot, P. & Tiollais, P. (2010). Hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC): molecular mechanisms and novel paradigms. *Pathol Biol (Paris)* **58**, 278–287.
- Fu, X., Tan, D., Hou, Z., Hu, Z., Liu, G., Ouyang, Y. & Liu, F. (2012). The effect of miR-338-3p on HBx deletion-mutant (HBx-d382) mediated liver-cell proliferation through CyclinD1 regulation. *PLoS ONE* **7**, e43204.
- He, G., Yu, G. Y., Temkin, V., Ogata, H., Kuntzen, C., Sakurai, T., Sieghart, W., Peck-Radosavljevic, M., Leffert, H. L. & Karin, M. (2010). Hepatocyte IKK β /NF- κ B inhibits tumor promotion and progression by preventing oxidative stress-driven STAT3 activation. *Cancer Cell* **17**, 286–297.
- Huo, T. I., Wang, X. W., Forgues, M., Wu, C. G., Spillare, E. A., Giannini, C., Brechot, C. & Harris, C. C. (2001). Hepatitis B virus X mutants derived from human hepatocellular carcinoma retain the ability to abrogate p53-induced apoptosis. *Oncogene* **20**, 3620–3628.

- Iavarone, M., Trabut, J. B., Delpuech, O., Carnot, F., Colombo, M., Kremsdorf, D., Bréchet, C. & Thiers, V. (2003). Characterisation of hepatitis B virus X protein mutants in tumour and non-tumour liver cells using laser capture microdissection. *J Hepatol* **39**, 253–261.
- Jiang, W., Wang, X. W., Unger, T., Forgues, M., Kim, J. W., Hussain, S. P., Bowman, E., Spillare, E. A., Lipsky, M. M. & other authors (2010). Cooperation of tumor-derived HBx mutants and p53-249(ser) mutant in regulating cell proliferation, anchorage-independent growth and aneuploidy in a telomerase-immortalized normal human hepatocyte-derived cell line. *Int J Cancer* **127**, 1011–1020.
- Jiang, Z., Jhunjhunwala, S., Liu, J., Haverty, P. M., Kennemer, M. I., Guan, Y., Lee, W., Carnevali, P., Stinson, J. & other authors (2012). The effects of hepatitis B virus integration into the genomes of hepatocellular carcinoma patients. *Genome Res* **22**, 593–601.
- Jung, S. Y. & Kim, Y. J. (2013). C-terminal region of HBx is crucial for mitochondrial DNA damage. *Cancer Lett* **331**, 76–83.
- Kew, M. C. (2011). Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* **26** (Suppl. 1), 144–152.
- Kremsdorf, D., Soussan, P., Paterlini-Brechot, P. & Brechet, C. (2006). Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: paradigms for viral-related human carcinogenesis. *Oncogene* **25**, 3823–3833.
- Kuang, S. Y., Jackson, P. E., Wang, J. B., Lu, P. X., Muñoz, A., Qian, G. S., Kensler, T. W. & Groopman, J. D. (2004). Specific mutations of hepatitis B virus in plasma predict liver cancer development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3575–3580.
- Lee, J. S., Chu, I. S., Mikaelyan, A., Calvisi, D. F., Heo, J., Reddy, J. K. & Thorgeirsson, S. S. (2004). Application of comparative functional genomics to identify best-fit mouse models to study human cancer. *Nat Genet* **36**, 1306–1311.
- Lee, J. H., Han, K. H., Lee, J. M., Park, J. H. & Kim, H. S. (2011). Impact of hepatitis B virus (HBV) x gene mutations on hepatocellular carcinoma development in chronic HBV infection. *Clin Vaccine Immunol* **18**, 914–921.
- Li, M., Zhu, M., Li, W., Lu, Y., Xie, X., Wu, Y. & Zheng, S. (2013). Alpha-fetoprotein receptor as an early indicator of HBx-driven hepatocarcinogenesis and its applications in tracing cancer cell metastasis. *Cancer Lett* **330**, 170–180.
- Lin-Marq, N., Bontron, S., Leupin, O. & Strubin, M. (2001). Hepatitis B virus X protein interferes with cell viability through interaction with the p127-kDa UV-damaged DNA-binding protein. *Virology* **287**, 266–274.
- Liu, X., Wang, L., Zhang, S., Lin, J., Zhang, S., Feitelson, M. A., Gao, H. & Zhu, M. (2008a). Mutations in the C-terminus of the X protein of hepatitis B virus regulate Wnt-5a expression in hepatoma Huh7 cells: cDNA microarray and proteomic analyses. *Carcinogenesis* **29**, 1207–1214.
- Liu, X., Zhang, S., Lin, J., Zhang, S., Feitelson, M. A., Gao, H. & Zhu, M. (2008b). Hepatitis B virus X protein mutants exhibit distinct biological activities in hepatoma Huh7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **373**, 643–647.
- Ma, N. F., Lau, S. H., Hu, L., Xie, D., Wu, J., Yang, J., Wang, Y., Wu, M. C., Fung, J. & other authors (2008). COOH-terminal truncated HBV X protein plays key role in hepatocarcinogenesis. *Clin Cancer Res* **14**, 5061–5068.
- Madden, C. R., Finegold, M. J. & Slagle, B. L. (2001). Hepatitis B virus X protein acts as a tumor promoter in development of diethylnitrosamine-induced preneoplastic lesions. *J Virol* **75**, 3851–3858.
- Maeda, S., Kamata, H., Luo, J. L., Leffert, H. & Karin, M. (2005). IKK β couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell* **121**, 977–990.
- Malmassari, S. L., Deng, Q., Fontaine, H., Houitte, D., Rimlinger, F., Thiers, V., Maillere, B., Pol, S. & Michel, M. L. (2007). Impact of hepatitis B virus basic core promoter mutations on T cell response to an immunodominant HBx-derived epitope. *Hepatology* **45**, 1199–1209.
- Min, L., He, B. & Hui, L. (2011). Mitogen-activated protein kinases in hepatocellular carcinoma development. *Semin Cancer Biol* **21**, 10–20.
- Naugler, W. E., Sakurai, T., Kim, S., Maeda, S., Kim, K., Elsharkawy, A. M. & Karin, M. (2007). Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science* **317**, 121–124.
- Nijhara, R., Jana, S. S., Goswami, S. K., Rana, A., Majumdar, S. S., Kumar, V. & Sarkar, D. P. (2001). Sustained activation of mitogen-activated protein kinases and activator protein 1 by the hepatitis B virus X protein in mouse hepatocytes in vivo. *J Virol* **75**, 10348–10358.
- Ogden, S. K., Lee, K. C. & Barton, M. C. (2000). Hepatitis B viral transactivator HBx alleviates p53-mediated repression of alpha-fetoprotein gene expression. *J Biol Chem* **275**, 27806–27814.
- Quétier, I., Brezillon, N., Duriez, M., Massinet, H., Giang, E., Ahodantin, J., Lamant, C., Brunelle, M. N., Soussan, P. & Kremsdorf, D. (2013). Hepatitis B virus HBx protein impairs liver regeneration through enhanced expression of IL-6 in transgenic mice. *J Hepatol* **59**, 285–291.
- Santos, N. P., Pereira, I. C., Pires, M. J., Lopes, C., Andrade, R., Oliveira, M. M., Colaço, A., Peixoto, F. & Oliveira, P. A. (2012). Histology, bioenergetics and oxidative stress in mouse liver exposed to N-diethylnitrosamine. *In Vivo* **26**, 921–929.
- Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nat Protoc* **3**, 1101–1108.
- Schneider, C., Teufel, A., Yeves, T., Staib, F., Hohmeyer, A., Walenda, G., Zimmermann, H. W., Vucur, M., Huss, S. & other authors (2012). Adaptive immunity suppresses formation and progression of diethylnitrosamine-induced liver cancer. *Gut* **61**, 1733–1743.
- Seki, E., Brenner, D. A. & Karin, M. (2012). A liver full of JNK: signaling in regulation of cell function and disease pathogenesis, and clinical approaches. *Gastroenterology* **143**, 307–320.
- Shirakata, Y. & Koike, K. (2003). Hepatitis B virus X protein induces cell death by causing loss of mitochondrial membrane potential. *J Biol Chem* **278**, 22071–22078.
- Sirma, H., Giannini, C., Poussin, K., Paterlini, P., Kremsdorf, D. & Bréchet, C. (1999). Hepatitis B virus X mutants, present in hepatocellular carcinoma tissue abrogate both the antiproliferative and transactivation effects of HBx. *Oncogene* **18**, 4848–4859.
- Sung, W. K., Zheng, H., Li, S., Chen, R., Liu, X., Li, Y., Lee, N. P., Lee, W. H., Ariyaratne, P. N. & other authors (2012). Genome-wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* **44**, 765–769.
- Sze, K. M., Chu, G. K., Lee, J. M. & Ng, I. O. (2013). C-terminal truncated hepatitis B virus x protein is associated with metastasis and enhances invasiveness by C-Jun/matrix metalloproteinase protein 10 activation in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **57**, 131–139.
- Tanaka, Y., Kanai, F., Ichimura, T., Tateishi, K., Asaoka, Y., Guleng, B., Jazag, A., Ohta, M., Imamura, J. & other authors (2006). The hepatitis B virus X protein enhances AP-1 activation through interaction with Jab1. *Oncogene* **25**, 633–642.
- Toh, S. T., Jin, Y., Liu, L., Wang, J., Babrzadeh, F., Gharizadeh, B., Ronaghi, M., Toh, H. C., Chow, P. K. & other authors (2013). Deep sequencing of the hepatitis B virus in hepatocellular carcinoma patients reveals enriched integration events, structural alterations and sequence variations. *Carcinogenesis* **34**, 787–798.
- Tu, H., Bonura, C., Giannini, C., Mouly, H., Soussan, P., Kew, M., Paterlini-Brechot, P., Bréchet, C. & Kremsdorf, D. (2001). Biological

impact of natural COOH-terminal deletions of hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma tissues. *Cancer Res* **61**, 7803–7810.

Verna, L., Whysner, J. & Williams, G. M. (1996). *N*-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacol Ther* **71**, 57–81.

Waris, G., Huh, K. W. & Siddiqui, A. (2001). Mitochondrially associated hepatitis B virus X protein constitutively activates transcription factors STAT-3 and NF- κ B via oxidative stress. *Mol Cell Biol* **21**, 7721–7730.

Wei, C., Ni, C., Song, T., Liu, Y., Yang, X., Zheng, Z., Jia, Y., Yuan, Y., Guan, K. & other authors (2010). The hepatitis B virus X protein disrupts innate immunity by downregulating mitochondrial antiviral signaling protein. *J Immunol* **185**, 1158–1168.

Xia, L., Huang, W., Tian, D., Zhu, H., Zhang, Y., Hu, H., Fan, D., Nie, Y. & Wu, K. (2012). Upregulated FoxM1 expression induced by hepatitis B virus X protein promotes tumor metastasis and indicates poor prognosis in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* **57**, 600–612.

Xiang, W. Q., Feng, W. F., Ke, W., Sun, Z., Chen, Z. & Liu, W. (2011). Hepatitis B virus X protein stimulates IL-6 expression in hepatocytes via a MyD88-dependent pathway. *J Hepatol* **54**, 26–33.

Yip, W. K., Cheng, A. S., Zhu, R., Lung, R. W., Tsang, D. P., Lau, S. S., Chen, Y., Sung, J. G., Lai, P. B. & other authors (2011). Carboxyl-terminal truncated HBx regulates a distinct microRNA transcription program in hepatocellular carcinoma development. *PLoS ONE* **6**, e22888.



ANNEXE 2



Hepatitis B virus HBx protein impairs liver regeneration through enhanced expression of IL-6 in transgenic mice

Ivan Quétier^{1,2,3}, Nicolas Brezillon^{1,2,3}, Marion Duriez^{1,2,3}, Hélène Massinet^{1,2,3}, Eric Giang^{1,2,3}, James Ahodantin^{1,2,3}, Céline Lamant^{1,2,3}, Marie-Noëlle Brunelle^{1,2,3}, Patrick Soussan^{1,2,3,4,5}, Dina Kremsdorf^{1,2,3,*}

¹Inserm, U845, Pathogenèse des hépatites virales B et immunothérapie, Paris, France; ²Université Paris Descartes, Sorbonne Paris-Cité, Faculté de Médecine Necker, Paris, France; ³Institut Pasteur, Département de Virologie, Paris, France; ⁴Service de Virologie, Hôpital Tenon, Paris, France; ⁵Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

Background & Aims: Conflicting results have been reported regarding the impact of hepatitis B virus X protein (HBx) expression on liver regeneration triggered by partial hepatectomy (PH). In the present report we investigated the mechanisms by which HBx protein alters hepatocyte proliferation after PH.

Methods: PH was performed on a transgenic mouse model in which HBx expression is under the control of viral regulatory elements and liver regeneration was monitored. LPS, IL-6 neutralizing antibody, and SB203580 were injected after PH to evaluate IL-6 participation during liver regeneration.

Results: Cell cycle progression of hepatocytes was delayed in HBx transgenic mice compared to WT animals. Moreover, HBx induced higher secretion of IL-6 soon after PH. Upregulation of IL-6 was associated with an elevation of STAT3 phosphorylation, SOCS3 transcript accumulation and a decrease in ERK1/2 phosphorylation in the livers of HBx transgenic mice. The involvement of IL-6 overexpression in cell cycle deregulation was confirmed by the inhibition of liver regeneration in control mice after the upregulation of IL-6 expression using LPS. In addition, IL-6 neutralization with antibodies was able to restore liver regeneration in HBx mice. Finally, the direct role of p38 in IL-6 secretion after PH was demonstrated using SB203580, a pharmacological inhibitor.

Conclusions: HBx is able to induce delayed hepatocyte proliferation after PH, and HBx-induced IL-6 overexpression is involved in delayed liver regeneration. By modulating IL-6 expression during liver proliferation induced by stimulation of the cellular microenvironment, HBx may participate in cell cycle deregulation and progression of liver disease.

© 2013 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Received 19 June 2012; received in revised form 19 February 2013; accepted 19 March 2013; available online 28 March 2013

* Corresponding author. Address: Inserm U845, CHU Necker, 156, rue de Vaugirard, 75015 Paris, France. Tel.: +33 1 40615343; fax: +33 1 40615581.

E-mail address: dina.kremsdorf@inserm.fr (D. Kremsdorf).

Abbreviations: PH, partial hepatectomy; HBV, hepatitis B virus; HCC, hepatocellular carcinoma; HBx, hepatitis B virus X protein.

Introduction

The liver has a unique capacity to regenerate after injury or partial hepatectomy (PH). It has been demonstrated that the evolution of liver diseases is dependent on repeated rounds of hepatocyte apoptosis or the constitutive expression of proliferative genes, and that hepatocyte proliferation is responsible for liver regeneration following a two-thirds PH. Liver regeneration after PH is a multi-step process that first involves an initiation phase, where multiple genes and pathways are activated to mediate the exit of hepatocytes from a quiescent state and progression through the cell cycle in a synchronous manner [1]. In mice, hepatocytes reach S phase peak around 40 h after PH [2]. Multiple factors can influence the regeneration process by supplying stimulatory and inhibitory signals for hepatocyte proliferation. Tumour necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6), together with their downstream transcription factors STAT3 and nuclear factor kappa B, are the most important initiating factors in the regenerative response [1,2]. Concerning IL-6, its role in hepatocyte proliferation seems to be dose-dependent. Indeed, liver regeneration is impaired in IL-6 knockout mice, while injection of IL-6 in wild type mice inhibits DNA synthesis after PH [3–5].

Hepatitis B virus (HBV) chronic infection is associated with hepatic lesions of variable severity, ranging from a practically normal liver to severe lesions of active chronic hepatitis that can develop into cirrhosis (for review see: [6]). HBV chronic infection may also be associated with the development of hepatocellular carcinoma (HCC) [7]. However, the onset of HCC is principally linked to chronic inflammation due to the host immune response to infected liver cells (90% of HCC develop on a cirrhotic liver) [7]. There is also evidence of a direct role for HBV in HCC development through integration of the viral genome in the host genome and expression of viral proteins [7]. In particular, hepatitis B virus X protein (HBx) is thought to play a major role in HCC [8]. Indeed, HBx expression is found in tumors and anti-HBx antibodies are present in sera of chronic carriers with liver disease [9,10]. Moreover, HBx sequences are frequently conserved in integrated viral DNA [11,12].

Research Article

HBx is a 17 kDa protein which participates in HBV transcription and exerts pleiotropic effects on different pathways involved in intracellular signalling, transcriptional activation, protein degradation, apoptosis and cell division, which may be responsible for the potential transforming activities of HBx [13,14]. HBx has been shown to activate cellular promoters of genes associated with cell proliferation such as *c-fos*, *IL-8*, *TNF- α* , *TGF- β* , and *EGFR*, and cytosolic signal transduction pathways such as Ras/Raf mitogen-activated protein kinase, Src kinases, c-jun N-terminal kinase, Jak1/STAT, and PK, which have opposite effects on cell proliferation and viability [13,14]. As an example, it has been shown that the activation of signal transduction pathways such as MAPK, JNK, and Src kinases by HBx protein stimulates cell cycle progression; by contrast, HBx protein can induce the expression of the cell cycle regulators p21 and p27 and block cells at the G1/S boundary [12,15]. These conflicting results have also been found in mouse models. It was shown that HBx protein was sufficient to induce HCC in certain HBx transgenic mice but not in others [16,17]. Differences in both mouse strains and levels of HBx protein expression might explain these discrepancies. Nevertheless, it was shown that HBx protein could potentiate the effects of chemical or biological carcinogens [17–19].

Previous studies had investigated the impact of HBx protein expression on liver regeneration after PH [20–22]. In these mouse models, conflicting results have been reported regarding the impact of the HBx protein on proliferation but the molecular mechanisms linked to the observed modulation of cell proliferation were not investigated. Discrepancies were probably due to the fact that promoter elements were not of the endogenous viral type, resulting in variations in the level of HBx protein expression which could underlie the different effects of HBx on liver regeneration after PH.

In the present study, we generated a mouse model in which HBx expression is controlled by the viral X promoter and enhancer I, in order to address the question of the impact of HBx expression on liver regeneration. Our data were consistent with an HBx-dependent delay of liver regeneration. We then focused on the early events following PH and demonstrated that HBx was able to induce IL-6 overexpression during liver regeneration, and that it was responsible for the delay in liver regeneration observed in HBx transgenic mice. Moreover, we elucidated the essential role of p38 in IL-6 secretion during liver regeneration after PH.

Materials and methods

Transgenic mice

To obtain the transgenic mice, the HBx gene isolated from a non-tumoural region of a patient with HCC [11] containing the myc-his tag was cloned downstream of the HBx promoter and enhancer I region (832–1371) and β -globin sequences (Supplementary Fig. 1A). Two independent lines were derived from the founders (pX-HBx-1336 and pX-HBx-1368) and expanded by backcrossing against the C57BL/6J strain (Institut Clinique de la Souris, Strasbourg, France). All the experiments were performed on male heterozygous transgenic mice. The animals were kept under pathogen-free conditions and 12-hour dark/light cycles and treated in accordance with the European Union regulations on animal care (Directive 86/609/EEC).

Animal experiments

A partial hepatectomy (PH) of 2/3 of the liver was performed between 07:00 and 10:00 on HBx mice and their wild type (WT) littermates at the age of 8–10 weeks, after a median laparotomy and under isoflurane inhalation anaesthesia. Liver

removal was used as time 0 during subsequent experiments. SB203580 (10 mg/kg, Sigma) was injected intraperitoneally 30 min before PH. LPS (4 mg/kg, Sigma) was injected 2 h after PH. Anti-mouse IL-6 neutralizing antibody (eBiosciences, clone MP5-20F3) was injected intravenously (100 μ g/mouse). All procedures were approved by the local Animal Care and Use Committee (accreditation no. A75-15-7-10) (“Comité de pilotage” at Necker Faculty of Medicine), in accordance with French regulations on ethics (Article L-1245-2 of the Huriet laws).

Bromodeoxyuridine analysis

For bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation, the animals received either one intraperitoneal (IP) injection (100 mg/kg, Sigma) two hours before euthanasia, or it was given *ad libitum* in drinking water (1 mg/ml) over 60 hours. On paraformaldehyde-fixed, paraffin-embedded liver sections (4 μ m), BrdU incorporation was revealed using monoclonal anti-BrdU antibody (Dako) and the VECTASTAIN Elite ABC kit (Vector). The BrdU index was obtained, by two different investigators, by counting 10 random high-power fields (about 3000 nuclei) and expressed as a percentage of BrdU-labelled nuclei.

Western blot

Total proteins were extracted from frozen liver tissues using a Tris 50 mM, NaCl 200 mM, 1% SDS, 1% sodium deoxycholate, 1% Triton X100, protease and phosphatase inhibitor cocktail (Pierce). Protein extracts were resolved on SDS-PAGE (10%) transferred onto a nitrocellulose membrane and incubated with the following primary antibodies: GAPDH (1/10,000) (Santacruz), PCNA (1/2000) (Dako), cyclin D1 (1/2000) (Interchim, clone SP4), phospho-STAT3 tyr705 (#9131), total STAT3 (#9132), phospho ERK1/2 (#9101), total ERK1/2 (#9102) (all at 1/1000) (Cell Signaling Technology). Secondary antibodies were either anti-mouse or anti-rabbit antibodies coupled with horseradish peroxidase, and bands were revealed using the ECL plus revelation system (Amersham).

RNA quantification

Total RNA was extracted from frozen liver tissues (Qiagen RNA kit) and quantified using Nanodrop. 1.5 μ g RNA was used for reverse transcription with random primers and SuperScript II (Invitrogen), according to the manufacturer's instruction. Two μ l cDNA was used for quantification with either the TaqMan or Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and TaqMan primers and probes specific to *IL-6*, *SOCS3* (Integrated DNA Technology) or *GAPDH* (forward: 5'-AGACGGC CGCATCTTCTGTGCA-3', reverse: 5'-GCCCAATACGGCCAAATCCGTTTC-3'); *cyclin D1* (forward: 5'-TGCTGGAGTCTGTGAGGAGCAG-3', reverse: 5'-CTGCAGGCGGCTCTTCAAGG-3'); *cyclin E1* (forward: 5'-GAGAGACTCGACGGACCACAGCA-3', reverse: 5'-TGGGTCTTGCAAAAACACGGCCA-3'). Quantification was performed on a Taqman 7500 (Applied Biosystems). For the analysis of real-time PCR data, the comparative C_T method (also referred to as the $2^{-\Delta\Delta C_T}$) was used [23]. Data were normalized using *GAPDH* as the housekeeping gene and expressed as the relative mRNA level compared to the quiescent liver of control animals.

ELISA

Serum samples were collected using the retro-orbital bleeding technique under light anaesthesia with isoflurane. Mouse IL-6 levels were detected using an ELISA kit (eBioscience) according to the manufacturer's recommendations.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the Student's *t* test and GraphPad Prism 5 software. Data are expressed as the mean \pm standard error and a *p* value <0.05 was considered to reveal a significant difference.

Results

Abnormal liver regeneration in HBx transgenic mice

Two HBx transgenic strains were obtained and characterized (Supplementary Fig. 1), and used to clarify the issue of the *in vivo* impact of HBx expression on liver regeneration after PH.

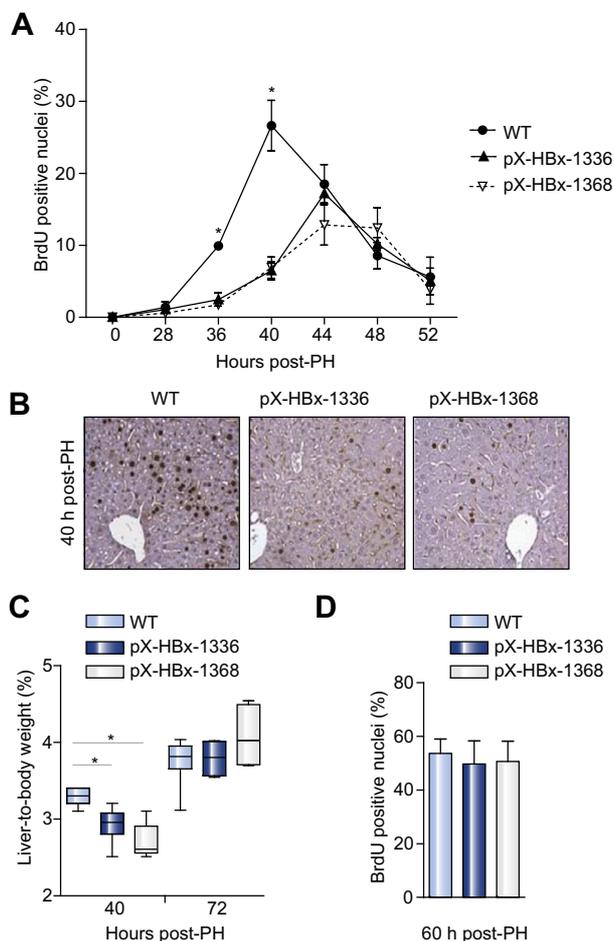


Fig. 1. Analysis of liver regeneration after PH. (A) Kinetics of BrdU incorporation in HBx transgenic mice, pX-HBx-1336, and pX-HBx-1368 at 28 h (n = 3 and 3), 36 h (n = 3 and 3), 40 h (n = 8 and 5), 44 h (n = 3 and 4), 48 h (n = 4 and 3), and 52 h (n = 3 and 4); and control mice (WT) at 28 h (n = 3), 36 h (n = 3), 40 h (n = 6), 44 h (n = 6), 48 h (n = 6), and 52 h (n = 4). BrdU was injected (IP) 2 h before sacrifice. Each point represents the mean percentage of BrdU-positive nuclei. (B) IHC staining of BrdU-positive hepatocytes 40 h post-PH. (C) Mean percentage of liver-to-body weight 40 and 72 h post-PH. (D) Mean percentage of BrdU-positive nuclei 60 h post-PH in pX-HBx-1336 (n = 4), pX-HBx-1368 (n = 3), and WT mice (n = 5). BrdU was given over a 60-hour period in drinking water. Error bars represent the standard error; *p < 0.05.

As a preliminary result, we demonstrated that PH did not modify HBx transcript and protein expression (Supplementary Fig. 2). To evaluate DNA synthesis, the BrdU labelling index was calculated as described in Materials and methods. In wild type animals, the kinetics of BrdU incorporation revealed maximum DNA synthesis 40 h post-PH, as expected. In both HBx transgenic strains, a less pronounced increase in BrdU staining was observed at 36 h and 40 h compared to non-transgenic control mice, with maximum DNA synthesis 44 h after PH (Fig. 1A and B). Furthermore, at 40 h post-PH, a significant decrease in the liver-to-body weight in both HBx transgenic strains was observed (Fig. 1C). However, hepatic mass was restored 72 h post-PH. Moreover, when BrdU was given during 60 h after PH, we observed a similar number of hepatocytes that underwent the S phase in HBx transgenic and control mice, indicating an absence of cell cycle blockage

(Fig. 1D). Our results show that despite an early decrease in DNA synthesis, hepatocytes expressing HBx were able to successfully accomplish a cell cycle.

HBx induces a delay in cell cycle progression during liver regeneration

In order to identify the genes modulated in HBx mice which participate in the liver regeneration defect, an RT-qPCR array was used to determine the level of expression of 83 genes belonging, in particular, to the cell cycle. A generally lower level of activation of genes related to the G1/S and G2/M phases was observed in HBx transgenic mice 40 h post-PH (Supplementary Table 1). We then used RT-qPCR to determine the mRNA expression levels of cyclin D1 and E1, 40 h and 44 h post-PH. A drastic reduction was observed in the expression of cyclin D1 and cyclin E1 transcripts at 40 h in both HBx transgenic mouse strains when compared to control mice, whereas the level of both cyclins was equivalent in all groups 44 h after PH (Fig. 2A and B). Western blot analysis confirmed the reduction in cyclin D1 levels at 40 h post-PH, in both HBx transgenic mice compared to controls (Fig. 2C). This was associated with a marked reduction of induction of the level of PCNA (Fig. 2C). At 44 h post-PH, similar levels of cyclin D1 and PCNA proteins were observed in both HBx transgenic and control mice (Fig. 2C). Taken together, our data were consistent with a delay in cell cycle progression, characterized by a weaker activation of cell cycle genes, without a cell cycle block. Further experiments were performed on pX-HBx-1336.

Overexpression of IL-6 during the initiation of liver regeneration in HBx transgenic mice

The absence of an abnormal checkpoint in HBx transgenic mice suggested that the delay in cell cycle activation might be due to a deregulation during the initial steps of liver regeneration. We therefore performed kinetic studies shortly after PH to investigate the expression of cytokines regulating the initiation of liver regeneration. Liver extracts were obtained 2, 4, and 8 h after PH, and the mRNA expression of IL-6 was measured by RT-qPCR. Interestingly, 2 h post-PH, a 4-fold higher induction of IL-6 mRNA was measured in HBx transgenic mice compared to control mice (Fig. 3A). Furthermore, 8 h post-PH, a 4-fold increase in circulating IL-6 levels was demonstrated in HBx transgenic mice when compared to control mice (Fig. 3B). We thus examined the activation levels of STAT3 8 h post-PH (Fig. 3C). In line with the increase in IL-6 expression, we observed an increase in STAT3 phosphorylation in HBx transgenic mice. This was associated with a reduction in phosphorylation of ERK1/2 and no effect on AKT phosphorylation (Fig. 3C). Moreover, we examined the level of mRNA expression of SOCS3, a direct target of STAT3. We observed a profile of expression similar to that of IL-6 secretion, with a two-fold increase in HBx mice 8 h post-PH (Fig. 3D). This deregulated pathway might therefore have been responsible for the delay in cell cycle progression in HBx mice.

IL-6 overexpression is responsible for delayed liver regeneration in HBx transgenic mice

It had previously been reported that LPS induced the secretion of IL-6 by Kupffer cells and that LPS inhibited cell cycle progression post-PH [24,25]. We therefore investigated whether LPS

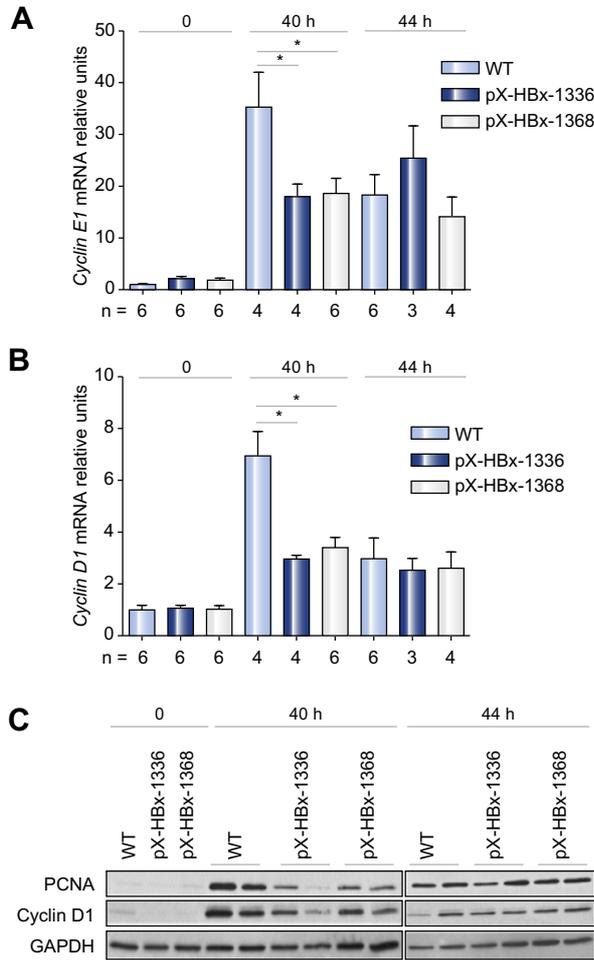


Fig. 2. Analysis of cell cycle gene expression during liver regeneration. (A) *Cyclin E1* and (B) *cyclin D1* mRNA expression was determined by RT-qPCR at 0, 40, and 44 h post-PH in the livers of pX-HBx-1336, pX-HBx-1368 transgenic and control mice (WT), and normalized to the *GAPDH* level of expression. Histograms represent the mean mRNA quantification of each group relative to the mean mRNA quantification of the quiescent liver of WT mice. Bars represent the standard error. (C) Western blot analyses of PCNA and cyclin D1 expression at 0, 40, and 44 h post-PH in pX-HBx-1336 and pX-HBx-1368 transgenic and control mice (WT). Error bars represent the standard error; **p* < 0.05.

stimulation in control animals could induce an IL-6 dependent inhibition of liver regeneration. To achieve this, LPS was injected into WT mice 2 h after PH, and mice were then killed 40 h post-PH. Eight h post-PH, a 50-fold increase in IL-6 secretion was observed in LPS-injected mice when compared to control mice (Fig. 4A). This dramatic increase in IL-6 secretion was associated with an inhibition of cell cycle progression 40 h post-PH (BrdU index lower than 1%) (Fig. 4B).

To determine whether the abolition of IL-6 signalling in HBx transgenic mice might restore normal liver regeneration, neutralizing anti-IL-6 antibody was injected 2 h after PH in both HBx transgenic and control mice. A similar BrdU index was observed in both groups 40 h post-PH (Fig. 4C). These data suggested the direct involvement of IL-6 overexpression in the delayed liver regeneration of HBx transgenic mice.

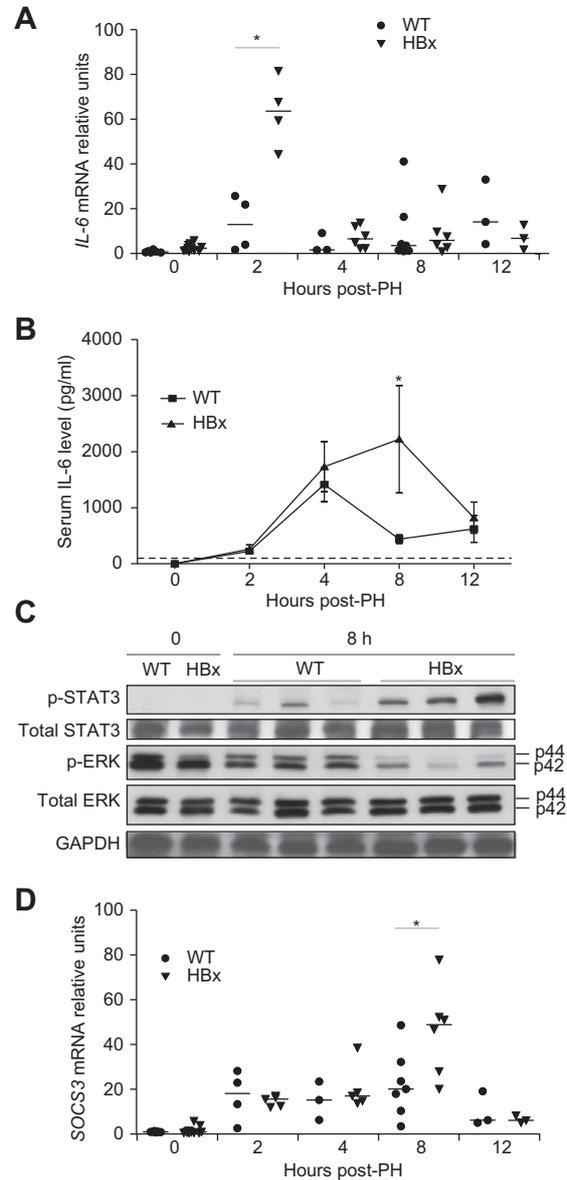


Fig. 3. Analysis of the initiation of liver regeneration. pX-HBx-1336 transgenic mice (HBx) and control mice (WT) were subjected to PH and sacrificed between 2 and 12 h post-PH. (A) *IL-6* mRNA expression was determined by RT-qPCR in pX-HBx-1336 at 0 (n = 14), 2 h (n = 4), 4 h (n = 6), 8 h (n = 6), and 12 h (n = 3); and in WT mice at 0 (n = 7), 2 h (n = 4), 4 h (n = 3), 8 h (n = 7), and 12 h (n = 3). (B) ELISA analysis of circulating IL-6 in pX-HBx-1336 at 0 (n = 3), 2 h (n = 6), 4 h (n = 6), 8 h (n = 7) and 12 h (n = 3); and in WT mice at 0 (n = 3), 2 h (n = 3), 4 h (n = 7), 8 h (n = 10), and 12 h (n = 3). The dashed bar corresponds to the limit of detection of the experiment (40 pg/ml). Error bars represent the standard error. (C) Western blot analysis of p-STAT3 (Tyr-705), STAT3, pERK (p-p44/p42; Thr-202/Tyr-204), ERK, and GAPDH at 0 and 8 h post-PH in the liver of pX-HBx-1336 and WT mice. Each lane represents a single mouse. (D) *SOCS3* mRNA expression was determined by RT-qPCR. Relative mRNA was normalized to the *GAPDH* level of expression. Bars represent the median; **p* < 0.05.

It has been recently demonstrated that MyD88-dependent pathways appear to be crucial for *IL-6* transcription during liver regeneration [26] and that, *in vitro*, HBx stimulates *IL-6* expression in a MyD88-dependent manner [27]. To investigate a

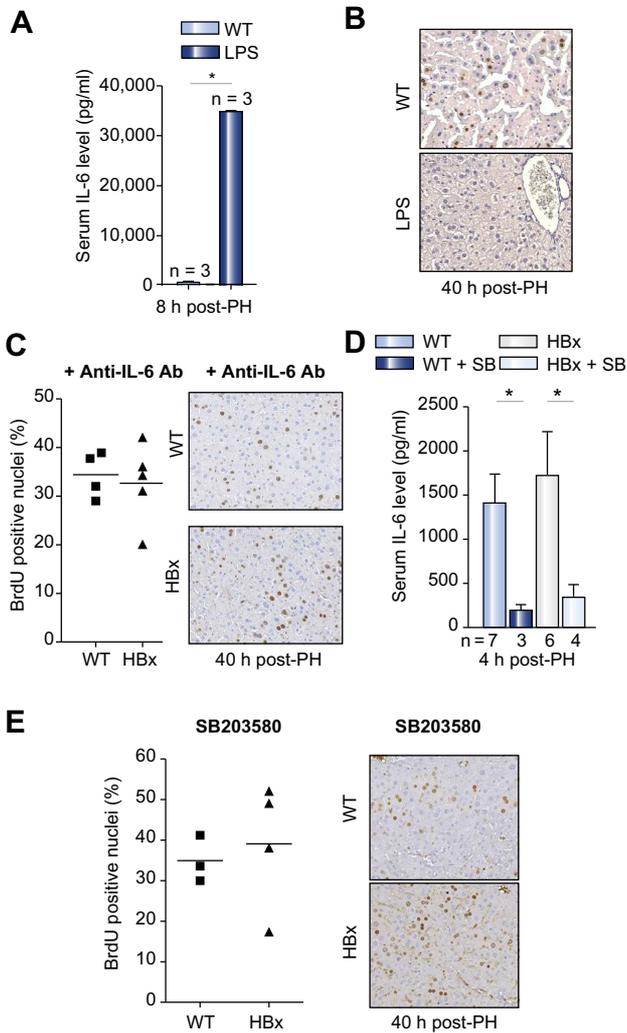


Fig. 4. Impact of IL-6 expression on liver regeneration. (A) ELISA analysis of circulating IL-6 in LPS-treated (n = 3) or untreated (n = 10) WT mice, 8 h post-PH and (B) IHC staining of BrdU-positive nuclei at 40 h post-PH. (C) Percentage of BrdU-positive nuclei in WT mice (n = 4) and pX-HBx-1336 (HBx) mice (n = 5) injected with neutralizing anti-IL-6 antibody and IHC staining of BrdU-positive nuclei at 40 h post-PH. (D) ELISA analysis of circulating IL-6 in treated (SB) (WT, n = 3; HBx, n = 4) or untreated (WT, n = 7; HBx, n = 6) mice, 4 h post-PH. (E) Percentage of BrdU-positive nuclei in treated mice and IHC staining of BrdU-positive nuclei at 40 h post-PH. The bar represents the mean. Error bars represent the standard error; *p < 0.05.

MyD88-dependent pathway overexpression of IL-6, p38, the kinase downstream of MyD88, was inhibited using a specific inhibitor, SB203580. At the peak of IL-6 secretion, a decrease in IL-6 secretion was observed in both the HBx and control mice thus treated (Fig. 4D). We also observed a recovery of the S phase peak in HBx mice (Fig. 4E). Surprisingly, the extent of S phase in SB203580-treated HBx mice seemed to be higher than that seen in untreated control mice. Nevertheless, as expected, by inhibiting IL-6 transcription in HBx mice, we were able to rescue liver regeneration. Overall, our findings indicated that the level of IL-6 secreted during the early stages of liver regeneration after PH could modulate the effectiveness of hepatocyte proliferation.

Discussion

To clarify the issue of the impact of HBx protein on liver regeneration, we generated transgenic mice expressing HBx under its own regulatory elements, allowing a more physiological regulation of HBx gene expression. In this context, we observed after PH that HBx protein was responsible for a delay in cell cycle progression. We further demonstrated that upregulation of IL-6, STAT3 activation, and blunted ERK1/2 phosphorylation were implicated in cell cycle deregulation induced by HBx protein. The involvement of IL-6 overexpression in cell cycle deregulation was confirmed by the inhibition of liver regeneration in LPS-treated control mice. Furthermore, we demonstrated normal liver regeneration in HBx transgenic mice when the IL-6 pathway was inhibited.

Previous studies had investigated the impact of HBx protein expression on liver regeneration after PH in distinct mouse models where the promoter elements were not of the endogenous viral type. Tralhao *et al.* showed a complete abolition of liver growth 8 days post-PH [20]. In our model, the impact of HBx was not as drastic, insofar as we observed a similar liver weight in HBx transgenic and control mice at 3 days post-PH. Wu *et al.* demonstrated a G1/S blockade and subsequent apoptosis during liver regeneration and the development of HCC [21]. The severe phenotype observed was probably a consequence of the high level of HBx expression. Indeed, in our transgenic mouse model where HBx expression was weaker, we did not detect any hepatocyte apoptosis during liver regeneration, or the development of HCC (data not shown). Finally, Hodgson *et al.* described premature cell cycle entry 28 h after PH [22]. At this time point, we did not detect any difference in DNA synthesis between HBx transgenic mice and control mice (Fig. 1A). Moreover, an analysis of cell cycle gene expression confirmed the delay in cell cycle progression in our HBx transgenic mice. Overall, these differences may account for a distinct regulation of transgene expression, genetic background and/or experimental approaches. Nevertheless, despite differences in the strength of the phenotypes, our findings were consistent with the previously described antiproliferative impact of HBx protein expression on liver regeneration.

An absence of cell cycle checkpoint arrest prompted us to focus on initiation events that might explain the delay in liver regeneration. Among the first cytokines secreted, TNF- α , released by Kupffer cells, is thought to act as an autocrine factor to induce IL-6 secretion [1,2]. Both cytokines are essential triggers for cell cycle entry after PH. During the early steps of liver regeneration in HBx transgenic mice, we observed an increase in IL-6 transcription but without a modulation of TNF- α transcription (data not shown). Furthermore, we saw an increase in the level and duration of circulating IL-6. Interestingly, a recent report showed that, *in vitro*, HBx could induce IL-6 secretion from a hepatoma cell line in a MyD88-dependent manner [27].

Despite the clear participation of IL-6 in triggering passage of resting hepatocytes into G1 after PH, a recent report demonstrated a lack of correlation between IL-6 levels and hepatocyte proliferation [26]. In addition, experiments involving the exogenous delivery of IL-6 produced contradictory results. On the one hand, some studies reported that liver regeneration in IL-6 knockout mice was impaired after PH, and that IL-6 administration substituted for the defect in hepatocyte proliferation [3]. By contrast, the injection of IL-6 in wild type mice or transgenic mice overexpressing the human soluble IL-6 receptor was able

Research Article

to inhibit DNA synthesis [4,5]. Thus, the stimulatory effect of IL-6 on hepatocyte DNA replication after PH probably occurs at a specific time point with a specific intrahepatic IL-6 concentration.

To confirm the impact of IL-6 expression modulation on liver regeneration, we induced an abnormal increase in IL-6 secretion or inhibition of the activation of the IL-6-dependent pathway. We demonstrated that in LPS-treated control mice, IL-6 was drastically enhanced and the mouse liver did not regenerate. Inversely, blocking IL-6 activation by using a neutralizing IL-6 antibody was able to rescue liver regeneration in HBx transgenic mice. An HBx-induced increase in IL-6 secretion in a hepatoma cell line was shown to be dependent on IRAK-1, p38/ERKs, and NF- κ B [27]. We were not able to detect any significant increase in p38 phosphorylation in the liver of HBx transgenic mice at any time point during liver regeneration (data not shown). Nevertheless, we decided to inhibit p38 activation during liver regeneration using a pharmacological approach and observed a marked reduction in IL-6 secretion in both control and HBx transgenic mice. This indicates that p38, downstream of MyD88, is the major pathway for IL-6 secretion during liver regeneration. Moreover, compared to control mice, HBx transgenic mice displayed an increase in BrdU incorporation at 40 h post-PH. This might be explained by IL-6-independent HBx proliferative activity, which needs to be characterized. Therefore, taken together, our experiments demonstrated a direct involvement of the level of IL-6 secretion in the delayed liver regeneration observed in HBx transgenic mice. One point which requires further investigation is the cellular origin of over-expressed IL-6 in HBx transgenic mice after PH. Indeed, we were not able to determine whether HBx activated IL-6 secretion from adult hepatocytes (as described *in vitro* [27]), or, as previously shown *in vivo*, this was triggered by the paracrine activation of Kupffer cells by an as yet undefined factor secreted by HBx-expressing hepatocytes [20].

We then examined the activation of downstream IL-6 effectors in HBx transgenic mice. We demonstrated a rise in STAT3 phosphorylation and a drastic reduction in the level of ERK1/2 phosphorylation. We also observed an accumulation of SOCS3 transcript, a negative regulator of STAT3-dependent signalling and ERK1/2 activation [28]. Our findings are in agreement with previous reports concerning the modulation of liver regeneration which showed that: (1) IL-6 stimulation before PH resulted in the activation of STAT3 and inhibition of hepatocyte proliferation, (2) STAT3 activation and SOCS3 expression may account for a reduction in ERK1/2 activation, and (3) a lack of SOCS3 enhances cell cycle progression [5,25,29].

Our work demonstrated that HBx may negatively modulate the cell cycle through unregulated IL-6 expression in a model of hepatocyte proliferation stimulated by PH. HBx has been shown to sensitize hepatocytes to HCC co-factors, including exposure to carcinogens and to other hepatitis viruses [17–19]; however, the effect of the enhanced IL-6 secretion caused by HBx on liver carcinogenesis remains elusive. Interestingly, it has been reported that IL-6 expression is correlated with impaired liver function during chronic hepatitis and HCC in HBV-infected patients [30,31]. Furthermore, a recent study clearly demonstrated the role of IL-6/STAT3 pathway activation in benign hepatocellular tumorigenesis [32]. Finally, a recent study showed in HBx transgenic mice, an increased tumorigenicity of hepatic progenitor cells through enhancement of IL-6/STAT3 and Wnt/ β -catenin pathways [33]. Overall, by modulating IL-6 expression during liver proliferation induced by cellular microenvironment

stimulation, HBx may participate in cell cycle deregulation and progression of liver disease.

Financial support

IQ was supported by a grant from the «Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche». The study was supported by grants from Inserm, ARC, and ANRS. N.B. and C.L. received a grant from the Bill and Melinda Gates Foundation. E.G. was supported by a grant from ANR. MN.B and H.M. were supported by a grant from the Medicen Paris Région. J.A. received a grant support from the FRM. M.D. received a grant from the ANRS.

Conflict of interest

The authors who have taken part in this study declared that they do not have anything to disclose regarding funding or conflict of interest with respect to this manuscript.

Acknowledgements

We thank Sophie Berissi for performing liver tissue inclusions.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2013.03.021>.

References

- [1] Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* 2006;43:S45–S53.
- [2] Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:836–847.
- [3] Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, et al. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* 1996;274:1379–1383.
- [4] Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:1441–1446.
- [5] Wustefeld T, Rakemann T, Kubicka S, Manns MP, Trautwein C. Hyperstimulation with interleukin 6 inhibits cell cycle progression after hepatectomy in mice. *Hepatology* 2000;32:514–522.
- [6] Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:51–68.
- [7] Brechot C, Kremsdorf D, Soussan P, Pineau P, Dejean A, Paterlini-Brechot P, et al. Hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC): molecular mechanisms and novel paradigms. *Pathol Biol* 2010;58:278–287.
- [8] Kew MC. Hepatitis B. Virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26:144–152.
- [9] Horiike N, Blumberg BS, Feitelson MA. Characteristics of hepatitis B X antigen, antibodies to X antigen, and antibodies to the viral polymerase during hepatitis B virus infection. *J Infect Dis* 1991;164:1104–1112.
- [10] Wang WL, London WT, Feitelson MA. Hepatitis B x antigen in hepatitis B virus carrier patients with liver cancer. *Cancer Res* 1991;51:4971–4977.
- [11] Tu H, Bonura C, Giannini C, Mouly H, Soussan P, Kew M, et al. Biological impact of natural COOH-terminal deletions of hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma tissues. *Cancer Res* 2001;61:7803–7810.
- [12] Sirma H, Giannini C, Poussin K, Paterlini P, Kremsdorf D, Brechot C. Hepatitis B virus X mutants, present in hepatocellular carcinoma tissue abrogate both

- the antiproliferative and transactivation effects of HBx. *Oncogene* 1999;18:4848–4859.
- [13] Wei Y, Neuveut C, Tiollais P, Buendia MA. Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene. *Pathol Biol* 2010;58:267–272.
- [14] Benhenda S, Cougot D, Buendia MA, Neuveut C. Hepatitis B virus X protein molecular functions and its role in virus life cycle and pathogenesis. *Adv Cancer Res* 2009;103:75–109.
- [15] Qiao L, Leach K, McKinstry R, Gilfor D, Yacoub A, Park JS, et al. Hepatitis B virus X protein increases expression of p21(Cip-1/WAF1/MDA6) and p27(Kip-1) in primary mouse hepatocytes, leading to reduced cell cycle progression. *Hepatology* 2001;34:906–917.
- [16] Kim CM, Koike K, Saito I, Miyamura T, Jay G. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* 1991;351:317–320.
- [17] Madden CR, Finegold MJ, Slagle BL. Hepatitis B virus X protein acts as a tumor promoter in development of diethylnitrosamine-induced preneoplastic lesions. *J Virol* 2001;75:3851–3858.
- [18] Keasler VV, Lerat H, Madden CR, Finegold MJ, McGarvey MJ, Mohammed EM, et al. Increased liver pathology in hepatitis C virus transgenic mice expressing the hepatitis B virus X protein. *Virology* 2006;347:466–475.
- [19] Madden CR, Finegold MJ, Slagle BL. Altered DNA mutation spectrum in aflatoxin b1-treated transgenic mice that express the hepatitis B virus x protein. *J Virol* 2002;76:11770–11774.
- [20] Tralhao JG, Roudier J, Morosan S, Giannini C, Tu H, Goulenok C, et al. Paracrine in vivo inhibitory effects of hepatitis B virus X protein (HBx) on liver cell proliferation: an alternative mechanism of HBx-related pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:6991–6996.
- [21] Wu BK, Li CC, Chen HJ, Chang JL, Jeng KS, Chou CK, et al. Blocking of G1/S transition and cell death in the regenerating liver of Hepatitis B virus X protein transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340:916–928.
- [22] Hodgson AJ, Keasler VV, Slagle BL. Premature cell cycle entry induced by hepatitis B virus regulatory HBx protein during compensatory liver regeneration. *Cancer Res* 2008;68:10341–10348.
- [23] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008;3:1101–1108.
- [24] Koleva M, Schlaf G, Landmann R, Gotze O, Jungermann K, Schieferdecker HL. Induction of anaphylatoxin C5a receptors in rat hepatocytes by lipopoly-saccharide in vivo: mediation by interleukin-6 from Kupffer cells. *Gastroenterology* 2002;122:697–708.
- [25] Dierssen U, Beraza N, Lutz HH, Liedtke C, Ernst M, Wasmuth HE, et al. Molecular dissection of gp130-dependent pathways in hepatocytes during liver regeneration. *J Biol Chem* 2008;283:9886–9895.
- [26] Vaquero J, Campbell JS, Haque J, McMahon RS, Riehle KJ, Bauer RL, et al. Toll-like receptor 4 and myeloid differentiation factor 88 provide mechanistic insights into the cause and effects of interleukin-6 activation in mouse liver regeneration. *Hepatology* 2011;54:597–608.
- [27] Xiang WQ, Feng WF, Ke W, Sun Z, Chen Z, Liu W. Hepatitis B virus X protein stimulates IL-6 expression in hepatocytes via a MyD88-dependent pathway. *J Hepatol* 2011;54:26–33.
- [28] Campbell JS, Prichard L, Schaper F, Schmitz J, Stephenson-Famy A, Rosenfeld ME, et al. Expression of suppressors of cytokine signaling during liver regeneration. *J Clin Invest* 2001;107:1285–1292.
- [29] Riehle KJ, Campbell JS, McMahan RS, Johnson MM, Beyer RP, Bammler TK, et al. Regulation of liver regeneration and hepatocarcinogenesis by suppressor of cytokine signaling 3. *J Exp Med* 2008;205:91–103.
- [30] Kao JT, Lai HC, Tsai SM, Lin PC, Chuang PH, Yu CJ, et al. Rather than interleukin-27, interleukin-6 expresses positive correlation with liver severity in naive hepatitis B infection patients. *Liver Int* 2012;32:928–936.
- [31] Wong VW, Yu J, Cheng AS, Wong GL, Chan HY, Chu ES, et al. High serum interleukin-6 level predicts future hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis B. *Int J Cancer* 2009;124:2766–2770.
- [32] Pilati C, Amessou M, Bihl MP, Balabaud C, Nhieu JT, Paradis V, et al. Somatic mutations activating STAT3 in human inflammatory hepatocellular adenomas. *J Exp Med* 2011;208:1359–1366.
- [33] Wang C, Yang W, Yan HX, Luo T, Zhang J, Tang L, et al. Hepatitis B virus X (HBx) induces tumorigenicity of hepatic progenitor cells in 3,5-diethoxy-carbonyl-1,4-dihydrocollidine-treated HBx transgenic mice. *Hepatology* 2012;55:108–120.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- Aalaei-Andabili, S. H. and S. M. Alavian (2012). "Regulatory T cells are the most important determinant factor of hepatitis B infection prognosis: a systematic review and meta-analysis." *Vaccine* **30**(38): 5595-5602.
- Abou-Jaoude, G. and C. Sureau (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.
- Adams, K. L. and J. F. Wendel (2005). "Polyploidy and genome evolution in plants." *Curr Opin Plant Biol* **8**(2): 135-141.
- Addison, W. R., K. A. Walters, et al. (2002). "Half-life of the duck hepatitis B virus covalently closed circular DNA pool in vivo following inhibition of viral replication." *J Virol* **76**(12): 6356-6363.
- Afdhal, N. H. and D. Nunes (2004). "Evaluation of liver fibrosis: a concise review." *Am J Gastroenterol* **99**(6): 1160-1174.
- Ahn, S. M., S. J. Jang, et al. (2014). "Genomic portrait of resectable hepatocellular carcinomas: implications of RB1 and FGF19 aberrations for patient stratification." *Hepatology* **60**(6): 1972-1982.
- Ahuja, P., E. Perriard, et al. (2007). "Re-expression of proteins involved in cytokinesis during cardiac hypertrophy." *Exp Cell Res* **313**(6): 1270-1283.
- Ali, A., H. Abdel-Hafiz, et al. (2014). "Hepatitis B virus, HBx mutants and their role in hepatocellular carcinoma." *World J Gastroenterol* **20**(30): 10238-10248.
- Alves, R. C., D. Alves, et al. (2011). "Advanced hepatocellular carcinoma. Review of targeted molecular drugs." *Ann Hepatol* **10**(1): 21-27.
- Anatskaya, O. V. and A. E. Vinogradov (2007). "Genome multiplication as adaptation to tissue survival: evidence from gene expression in mammalian heart and liver." *Genomics* **89**(1): 70-80.
- Anatskaya, O. V. and A. E. Vinogradov (2010). "Somatic polyploidy promotes cell function under stress and energy depletion: evidence from tissue-specific mammal transcriptome." *Funct Integr Genomics* **10**(4): 433-446.
- Anatskaya, O. V., A. E. Vinogradov, et al. (1994). "Hepatocyte polyploidy and metabolism/life-history traits: hypotheses testing." *J Theor Biol* **168**(2): 191-199.
- Ando, K., T. Moriyama, et al. (1993). "Mechanisms of class I restricted immunopathology. A transgenic mouse model of fulminant hepatitis." *J Exp Med* **178**(5): 1541-1554.
- Andreassen, P. R., O. D. Lohez, et al. (2001). "Tetraploid state induces p53-dependent arrest of nontransformed mammalian cells in G1." *Mol Biol Cell* **12**(5): 1315-1328.
- Anti, M., G. Marra, et al. (1994). "DNA ploidy pattern in human chronic liver diseases and hepatic nodular lesions. Flow cytometric analysis on echo-guided needle liver biopsy." *Cancer* **73**(2): 281-288.
- Aoyama, T., Y. H. Paik, et al. (2012). "Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in experimental liver fibrosis: GKT137831 as a novel potential therapeutic agent." *Hepatology* **56**(6): 2316-2327.
- Arzumanyan, A., T. Friedman, et al. (2012). "Epigenetic repression of E-cadherin expression by hepatitis B virus x antigen in liver cancer." *Oncogene* **31**(5): 563-572.

- Arzumanyan, A., V. Sambandam, et al. (2012). "Hedgehog signaling blockade delays hepatocarcinogenesis induced by hepatitis B virus X protein." *Cancer Res* **72**(22): 5912-5920.
- Asabe, S., S. F. Wieland, et al. (2009). "The size of the viral inoculum contributes to the outcome of hepatitis B virus infection." *J Virol* **83**(19): 9652-9662.
- Asahina, K., M. Shiokawa, et al. (2006). "Multiplicative mononuclear small hepatocytes in adult rat liver: their isolation as a homogeneous population and localization to periportal zone." *Biochem Biophys Res Commun* **342**(4): 1160-1167.
- Assrir, N., P. Soussan, et al. (2010). "Role of the hepatitis B virus proteins in pro- and anti-apoptotic processes." *Front Biosci (Landmark Ed)* **15**: 12-24.
- Attallah, A. M., A. A. Tabll, et al. (1999). "DNA ploidy of liver biopsies from patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma: a flow cytometric analysis." *Cancer Lett* **142**(1): 65-69.
- Auer, G. U., M. Backdahl, et al. (1985). "Ploidy levels in nonneoplastic and neoplastic thyroid cells." *Anal Quant Cytol Histol* **7**(2): 97-106.
- Austin, L. S., A. Kaushansky, et al. (2014). "Susceptibility to Plasmodium liver stage infection is altered by hepatocyte polyploidy." *Cell Microbiol* **16**(5): 784-795.
- Avila, M. A., C. Berasain, et al. (2006). "New therapies for hepatocellular carcinoma." *Oncogene* **25**(27): 3866-3884.
- Aydinlik, H., T. D. Nguyen, et al. (2001). "Selective pressure during tumor promotion by phenobarbital leads to clonal outgrowth of beta-catenin-mutated mouse liver tumors." *Oncogene* **20**(53): 7812-7816.
- Baron, J. L., L. Gardiner, et al. (2002). "Activation of a nonclassical NKT cell subset in a transgenic mouse model of hepatitis B virus infection." *Immunity* **16**(4): 583-594.
- Bartenschlager, R. and H. Schaller (1992). "Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome." *EMBO J* **11**(9): 3413-3420.
- Bartholomeusz, A., B. G. Tehan, et al. (2004). "Comparisons of the HBV and HIV polymerase, and antiviral resistance mutations." *Antivir Ther* **9**(2): 149-160.
- Basagoudanavar, S. H., D. H. Perlman, et al. (2007). "Regulation of hepadnavirus reverse transcription by dynamic nucleocapsid phosphorylation." *J Virol* **81**(4): 1641-1649.
- Basto, R., K. Brunk, et al. (2008). "Centrosome amplification can initiate tumorigenesis in flies." *Cell* **133**(6): 1032-1042.
- Basu, S. (2003). "Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients." *Toxicology* **189**(1-2): 113-127.
- Bataller, R. and D. A. Brenner (2005). "Liver fibrosis." *J Clin Invest* **115**(2): 209-218.
- Bayer, M. E., B. S. Blumberg, et al. (1968). "Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukaemia, Down's Syndrome and hepatitis." *Nature* **218**(5146): 1057-1059.
- Bayliss, J., L. Lim, et al. (2013). "Hepatitis B virus splicing is enhanced prior to development of hepatocellular carcinoma." *J Hepatol* **59**(5): 1022-1028.
- Beath, S. V. (2003). "Hepatic function and physiology in the newborn." *Semin Neonatol* **8**(5): 337-346.
- Becker, S. A., T. H. Lee, et al. (1998). "Hepatitis B virus X protein interferes with cellular DNA repair." *J Virol* **72**(1): 266-272.

- Bedossa, P., D. Dargere, et al. (2003). "Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C." *Hepatology* **38**(6): 1449-1457.
- Behari, J., T. H. Yeh, et al. (2010). "Liver-specific beta-catenin knockout mice exhibit defective bile acid and cholesterol homeostasis and increased susceptibility to diet-induced steatohepatitis." *Am J Pathol* **176**(2): 744-753.
- Behari, J., G. Zeng, et al. (2007). "R-Etodolac decreases beta-catenin levels along with survival and proliferation of hepatoma cells." *J Hepatol* **46**(5): 849-857.
- Bell, S. P. and A. Dutta (2002). "DNA replication in eukaryotic cells." *Annu Rev Biochem* **71**: 333-374.
- Belloni, L., L. Allweiss, et al. (2012). "IFN-alpha inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome." *J Clin Invest* **122**(2): 529-537.
- Belloni, L., T. Pollicino, et al. (2009). "Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(47): 19975-19979.
- Benhenda, S., A. Ducroux, et al. (2013). "Methyltransferase PRMT1 is a binding partner of HBx and a negative regulator of hepatitis B virus transcription." *J Virol* **87**(8): 4360-4371.
- Benn, J. and R. J. Schneider (1995). "Hepatitis B virus HBx protein deregulates cell cycle checkpoint controls." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(24): 11215-11219.
- Berasain, C., D. Patil, et al. (1998). "Oncogenic activation of a human cyclin A2 targeted to the endoplasmic reticulum upon hepatitis B virus genome insertion." *Oncogene* **16**(10): 1277-1288.
- Berenguer, M. and D. Schuppan (2013). "Progression of liver fibrosis in post-transplant hepatitis C: mechanisms, assessment and treatment." *J Hepatol* **58**(5): 1028-1041.
- Bill, C. A. and J. Summers (2004). "Genomic DNA double-strand breaks are targets for hepadnaviral DNA integration." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(30): 11135-11140.
- Bilzer, M., F. Roggel, et al. (2006). "Role of Kupffer cells in host defense and liver disease." *Liver Int* **26**(10): 1175-1186.
- Blanchet, M. and C. Sureau (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.
- Blangy, A., H. A. Lane, et al. (1995). "Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo." *Cell* **83**(7): 1159-1169.
- Blondot, M. L., V. Brusa, et al. (2016). "Intracellular transport and egress of hepatitis B virus." *J Hepatol* **64**(1 Suppl): S49-59.
- Bloom, J. and M. Pagano (2003). "Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation." *Semin Cancer Biol* **13**(1): 41-47.
- Blow, J. J. and A. Dutta (2005). "Preventing re-replication of chromosomal DNA." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(6): 476-486.
- Blumberg, B. S., H. J. Alter, et al. (1965). "A "New" Antigen in Leukemia Sera." *JAMA* **191**: 541-546.
- Blumberg, B. S., A. I. Sutnick, et al. (1969). "Australia antigen and hepatitis." *JAMA* **207**(10): 1895-1896.

- Bock, C. T., S. Schwinn, et al. (2001). "Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome." *J Mol Biol* **307**(1): 183-196.
- Boehme, K. W. and T. Compton (2004). "Innate sensing of viruses by toll-like receptors." *J Virol* **78**(15): 7867-7873.
- Boleti, H., E. Karsenti, et al. (1996). "Xklp2, a novel *Xenopus* centrosomal kinesin-like protein required for centrosome separation during mitosis." *Cell* **84**(1): 49-59.
- Boni, C., D. Laccabue, et al. (2012). "Restored function of HBV-specific T cells after long-term effective therapy with nucleos(t)ide analogues." *Gastroenterology* **143**(4): 963-973 e969.
- Bosch, F. X., J. Ribes, et al. (2004). "Primary liver cancer: worldwide incidence and trends." *Gastroenterology* **127**(5 Suppl 1): S5-S16.
- Bouchard, M. J., R. J. Puro, et al. (2003). "Activation and inhibition of cellular calcium and tyrosine kinase signaling pathways identify targets of the HBx protein involved in hepatitis B virus replication." *J Virol* **77**(14): 7713-7719.
- Bouchard, M. J., L. Wang, et al. (2006). "Activation of focal adhesion kinase by hepatitis B virus HBx protein: multiple functions in viral replication." *J Virol* **80**(9): 4406-4414.
- Bouchard, M. J., L. H. Wang, et al. (2001). "Calcium signaling by HBx protein in hepatitis B virus DNA replication." *Science* **294**(5550): 2376-2378.
- Boulter, L., O. Govaere, et al. (2012). "Macrophage-derived Wnt opposes Notch signaling to specify hepatic progenitor cell fate in chronic liver disease." *Nat Med* **18**(4): 572-579.
- Bouvier, G. L. and A. Williams (1975). "Serotypes of hepatitis B antigen (HBs Ag): the problem of "new" determinants, as exemplified by "t"." *Am J Med Sci* **270**(1): 165-171.
- Boyault, S., D. S. Rickman, et al. (2007). "Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets." *Hepatology* **45**(1): 42-52.
- Brassard, D. L., M. J. Grace, et al. (2002). "Interferon-alpha as an immunotherapeutic protein." *J Leukoc Biol* **71**(4): 565-581.
- Brechot, C., C. Pourcel, et al. (1980). "Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma." *Nature* **286**(5772): 533-535.
- Breitkopf, K., P. Godoy, et al. (2006). "TGF-beta/Smad signaling in the injured liver." *Z Gastroenterol* **44**(1): 57-66.
- Bressac, B., M. Kew, et al. (1991). "Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa." *Nature* **350**(6317): 429-431.
- Brezillon, N., M. N. Brunelle, et al. (2011). "Antiviral activity of Bay 41-4109 on hepatitis B virus in humanized Alb-uPA/SCID mice." *PLoS One* **6**(12): e25096.
- Brito, D. A. and C. L. Rieder (2006). "Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint." *Curr Biol* **16**(12): 1194-1200.
- Brodsky, W. Y., A. M. Arefyeva, et al. (1980). "Mitotic polyploidization of mouse heart myocytes during the first postnatal week." *Cell Tissue Res* **210**(1): 133-144.
- Brodsky, W. Y. and I. V. Uryvaeva (1977). "Cell polyploidy: its relation to tissue growth and function." *Int Rev Cytol* **50**: 275-332.
- Bruni, R., E. D'Ugo, et al. (2003). "Scaffold attachment region located in a locus targeted by hepadnavirus integration in hepatocellular carcinomas." *Cancer Detect Prev* **27**(3): 175-181.

- Bruni, R., E. D'Ugo, et al. (1999). "Activation of the N-myc2 oncogene by woodchuck hepatitis virus integration in the linked downstream b3n locus in woodchuck hepatocellular carcinoma." Virology **257**(2): 483-490.
- Bruni, R., E. D'Ugo, et al. (2004). "The win locus involved in activation of the distal N-myc2 gene upon WHV integration in woodchuck liver tumors harbors S/MAR elements." Virology **329**(1): 1-10.
- Bruss, V. (2007). "Hepatitis B virus morphogenesis." World J Gastroenterol **13**(1): 65-73.
- Bruss, V. and K. Vieluf (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.
- Buckingham, M. (2006). "Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates." Curr Opin Genet Dev **16**(5): 525-532.
- Buckwold, V. E., Z. Xu, et al. (1996). "Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication." J Virol **70**(9): 5845-5851.
- Burkard, M. E., C. L. Randall, et al. (2007). "Chemical genetics reveals the requirement for Polo-like kinase 1 activity in positioning RhoA and triggering cytokinesis in human cells." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(11): 4383-4388.
- Burton, D. R., R. A. Williamson, et al. (2000). "Antibody and virus: binding and neutralization." Virology **270**(1): 1-3.
- Cadoret, A., C. Ovejero, et al. (2001). "Hepatomegaly in transgenic mice expressing an oncogenic form of beta-catenin." Cancer Res **61**(8): 3245-3249.
- Cadranel, J. F., P. Lahmek, et al. (2007). "Epidemiology of chronic hepatitis B infection in France: risk factors for significant fibrosis--results of a nationwide survey." Aliment Pharmacol Ther **26**(4): 565-576.
- Cadranel, J. F., P. Rufat, et al. (2000). "Practices of liver biopsy in France: results of a prospective nationwide survey. For the Group of Epidemiology of the French Association for the Study of the Liver (AFEF)." Hepatology **32**(3): 477-481.
- Cai, D., C. Mills, et al. (2012). "Identification of disubstituted sulfonamide compounds as specific inhibitors of hepatitis B virus covalently closed circular DNA formation." Antimicrob Agents Chemother **56**(8): 4277-4288.
- Cairo, S., C. Armengol, et al. (2008). "Hepatic stem-like phenotype and interplay of Wnt/beta-catenin and Myc signaling in aggressive childhood liver cancer." Cancer Cell **14**(6): 471-484.
- Calado, R. T. and N. S. Young (2009). "Telomere diseases." N Engl J Med **361**(24): 2353-2365.
- Calvisi, D. F., S. Ladu, et al. (2004). "Disregulation of E-cadherin in transgenic mouse models of liver cancer." Lab Invest **84**(9): 1137-1147.
- Calvisi, D. F., F. Pinna, et al. (2008). "Dual-specificity phosphatase 1 ubiquitination in extracellular signal-regulated kinase-mediated control of growth in human hepatocellular carcinoma." Cancer Res **68**(11): 4192-4200.
- Campagna, M. R., F. Liu, et al. (2013). "Sulfamoylbenzamide derivatives inhibit the assembly of hepatitis B virus nucleocapsids." J Virol **87**(12): 6931-6942.
- Campisi, J. (2005). "Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors." Cell **120**(4): 513-522.

- Campisi, J. (2005). "Suppressing cancer: the importance of being senescent." *Science* **309**(5736): 886-887.
- Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna (2007). "Cellular senescence: when bad things happen to good cells." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(9): 729-740.
- Canbay, A., A. E. Feldstein, et al. (2003). "Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression." *Hepatology* **38**(5): 1188-1198.
- Canbay, A., S. Friedman, et al. (2004). "Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis." *Hepatology* **39**(2): 273-278.
- Canbay, A., P. Taimr, et al. (2003). "Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic." *Lab Invest* **83**(5): 655-663.
- Cane, P. A., D. Mutimer, et al. (1999). "Analysis of hepatitis B virus quasispecies changes during emergence and reversion of lamivudine resistance in liver transplantation." *Antivir Ther* **4**(1): 7-14.
- Carow, C. E., N. E. Fox, et al. (2001). "Kinetics of endomitosis in primary murine megakaryocytes." *J Cell Physiol* **188**(3): 291-303.
- Carretero, M., M. Gomez-Gonzalo, et al. (2002). "The hepatitis B virus X protein binds to and activates the NH(2)-terminal trans-activation domain of nuclear factor of activated T cells-1." *Virology* **299**(2): 288-300.
- Celton-Morizur, S. and C. Desdouets (2010). "Polyploidization of liver cells." *Adv Exp Med Biol* **676**: 123-135.
- Celton-Morizur, S., G. Merlen, et al. (2010). "Polyploidy and liver proliferation: central role of insulin signaling." *Cell Cycle* **9**(3): 460-466.
- Celton-Morizur, S., G. Merlen, et al. (2009). "The insulin/Akt pathway controls a specific cell division program that leads to generation of binucleated tetraploid liver cells in rodents." *J Clin Invest* **119**(7): 1880-1887.
- Chami, M., D. Ferrari, et al. (2003). "Caspase-dependent alterations of Ca²⁺ signaling in the induction of apoptosis by hepatitis B virus X protein." *J Biol Chem* **278**(34): 31745-31755.
- Chami, M., D. Gozuacik, et al. (2000). "Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis implicates SERCA1 gene in the control of apoptosis." *Oncogene* **19**(25): 2877-2886.
- Chan, H. L., A. Y. Hui, et al. (2004). "Genotype C hepatitis B virus infection is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma." *Gut* **53**(10): 1494-1498.
- Chan, H. L., C. H. Tse, et al. (2008). "High viral load and hepatitis B virus subgenotype ce are associated with increased risk of hepatocellular carcinoma." *J Clin Oncol* **26**(2): 177-182.
- Chang, Q., Y. Zhang, et al. (2009). "Sustained JNK1 activation is associated with altered histone H3 methylations in human liver cancer." *J Hepatol* **50**(2): 323-333.
- Chang, S. F., H. J. Netter, et al. (2001). "Duck hepatitis B virus expresses a regulatory HBx-like protein from a hidden open reading frame." *J Virol* **75**(1): 161-170.
- Chao, D. Y., B. Dilkes, et al. (2013). "Polyploids exhibit higher potassium uptake and salinity tolerance in Arabidopsis." *Science* **341**(6146): 658-659.
- Chen, C. T., H. Hehnlly, et al. (2012). "Orchestrating vesicle transport, ESCRTs and kinase surveillance during abscission." *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**(8): 483-488.

- Chen, H. S., S. Kaneko, et al. (1993). "The woodchuck hepatitis virus X gene is important for establishment of virus infection in woodchucks." *J Virol* **67**(3): 1218-1226.
- Chen, H. Z., M. M. Ouseph, et al. (2012). "Canonical and atypical E2Fs regulate the mammalian endocycle." *Nat Cell Biol* **14**(11): 1192-1202.
- Chen, Q. Y., T. J. Harrison, et al. (2014). "The Effect of HBV Genotype C on the Development of HCC Differs Between Wild-Type Viruses and Those With BCP Double Mutations (T(1762)A(1764))." *Hepat Mon* **14**(2): e16214.
- Chen, W. N., J. Y. Chen, et al. (2012). "Interaction of the hepatitis B spliced protein with cathepsin B promotes hepatoma cell migration and invasion." *J Virol* **86**(24): 13533-13541.
- Cheng, B., Y. Zheng, et al. (2010). "Hepatitis B viral X protein alters the biological features and expressions of DNA repair enzymes in LO2 cells." *Liver Int* **30**(2): 319-326.
- Chiang, D. Y., A. Villanueva, et al. (2008). "Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma." *Cancer Res* **68**(16): 6779-6788.
- Chien, W. W. and M. Ffrench (2006). "[Regulation of p16INK4a, senescence and oncogenesis]." *Med Sci (Paris)* **22**(10): 865-871.
- Chin, R., L. Earnest-Silveira, et al. (2007). "Modulation of MAPK pathways and cell cycle by replicating hepatitis B virus: factors contributing to hepatocarcinogenesis." *J Hepatol* **47**(3): 325-337.
- Ching, R. H. H., K. M. F. Sze, et al. (2017). "C-terminal truncated hepatitis B virus X protein regulates tumorigenicity, self-renewal and drug resistance via STAT3/Nanog signaling pathway." *Oncotarget* **8**(14): 23507-23516.
- Chipchase, M. D., M. O'Neill, et al. (2003). "Characterization of premature liver polyploidy in DNA repair (Ercc1)-deficient mice." *Hepatology* **38**(4): 958-966.
- Chirillo, P., S. Pagano, et al. (1997). "The hepatitis B virus X gene induces p53-mediated programmed cell death." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(15): 8162-8167.
- Chisari, F. V. and C. Ferrari (1995). "Hepatitis B virus immunopathogenesis." *Annu Rev Immunol* **13**: 29-60.
- Chisari, F. V., P. Filippi, et al. (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, F. V., M. Isogawa, et al. (2010). "Pathogenesis of hepatitis B virus infection." *Pathol Biol (Paris)* **58**(4): 258-266.
- Chiu, C. M., S. H. Yeh, et al. (2007). "Hepatitis B virus X protein enhances androgen receptor-responsive gene expression depending on androgen level." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(8): 2571-2578.
- Chng, W. J., E. Braggio, et al. (2008). "The centrosome index is a powerful prognostic marker in myeloma and identifies a cohort of patients that might benefit from aurora kinase inhibition." *Blood* **111**(3): 1603-1609.
- Cho, H. K., S. Y. Kim, et al. (2015). "HBx induces the proliferation of hepatocellular carcinoma cells via AP1 over-expressed as a result of ER stress." *Biochem J* **466**(1): 115-121.
- Choi, Y., S. Gyoo Park, et al. (2005). "Calcium ions affect the hepatitis B virus core assembly." *Virology* **332**(1): 454-463.

- Chotiyaputta, W. and A. S. Lok (2009). "Hepatitis B virus variants." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **6**(8): 453-462.
- Chou, H. H., W. H. Chien, et al. (2015). "Age-related immune clearance of hepatitis B virus infection requires the establishment of gut microbiota." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(7): 2175-2180.
- Chu, C. M. and Y. F. Liaw (1997). "Natural history of chronic hepatitis B virus infection: an immunopathological study." J Gastroenterol Hepatol **12**(9-10): S218-222.
- Chung, T. W., Y. C. Lee, et al. (2004). "Hepatitis B viral HBx induces matrix metalloproteinase-9 gene expression through activation of ERK and PI-3K/AKT pathways: involvement of invasive potential." FASEB J **18**(10): 1123-1125.
- Cimini, D. (2008). "Merotelic kinetochore orientation, aneuploidy, and cancer." Biochim Biophys Acta **1786**(1): 32-40.
- Ciriello, G., M. L. Miller, et al. (2013). "Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers." Nat Genet **45**(10): 1127-1133.
- Clawson, G. A., L. J. Blankenship, et al. (1992). "Nuclear enlargement induced by hepatocarcinogens alters ploidy." Cancer Res **52**(5): 1304-1308.
- Cleary, S. P., W. R. Jeck, et al. (2013). "Identification of driver genes in hepatocellular carcinoma by exome sequencing." Hepatology **58**(5): 1693-1702.
- Clippinger, A. J. and M. J. Bouchard (2008). "Hepatitis B virus HBx protein localizes to mitochondria in primary rat hepatocytes and modulates mitochondrial membrane potential." J Virol **82**(14): 6798-6811.
- Colgrove, R., G. Simon, et al. (1989). "Transcriptional activation of homologous and heterologous genes by the hepatitis B virus X gene product in cells permissive for viral replication." J Virol **63**(9): 4019-4026.
- Colnot, S., T. Decaens, et al. (2004). "Liver-targeted disruption of Apc in mice activates beta-catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(49): 17216-17221.
- Comai, L. (2005). "The advantages and disadvantages of being polyploid." Nat Rev Genet **6**(11): 836-846.
- Coombes, J. D., S. S. Choi, et al. (2016). "Osteopontin is a proximal effector of leptin-mediated non-alcoholic steatohepatitis (NASH) fibrosis." Biochim Biophys Acta **1862**(1): 135-144.
- Cougot, D., Y. Wu, et al. (2007). "The hepatitis B virus X protein functionally interacts with CREB-binding protein/p300 in the regulation of CREB-mediated transcription." J Biol Chem **282**(7): 4277-4287.
- Coulouarn, C., V. M. Factor, et al. (2009). "Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties." Oncogene **28**(40): 3526-3536.
- Courouce, A. M., F. Bouchardeau, et al. (1983). "The use of hepatitis B vaccine as booster for donors immune to HBV for the production of hepatitis B immunoglobulin (HBIG)." Dev Biol Stand **54**: 333-340.
- Cova, L. (2017). "Present and future DNA vaccines for chronic hepatitis B treatment." Expert Opin Biol Ther **17**(2): 185-195.

- Cui, M., Y. Wang, et al. (2014). "MiR-205 modulates abnormal lipid metabolism of hepatoma cells via targeting acyl-CoA synthetase long-chain family member 1 (ACSL1) mRNA." *Biochem Biophys Res Commun* **444**(2): 270-275.
- Cui, M., Z. Xiao, et al. (2014). "Involvement of cholesterol in hepatitis B virus X protein-induced abnormal lipid metabolism of hepatoma cells via up-regulating miR-205-targeted ACSL4." *Biochem Biophys Res Commun* **445**(3): 651-655.
- Cullen, B. R. (2004). "Transcription and processing of human microRNA precursors." *Mol Cell* **16**(6): 861-865.
- D'Avino, P. P. (2009). "How to scaffold the contractile ring for a safe cytokinesis - lessons from Anillin-related proteins." *J Cell Sci* **122**(Pt 8): 1071-1079.
- D'Avino, P. P., M. S. Savoian, et al. (2005). "Cleavage furrow formation and ingression during animal cytokinesis: a microtubule legacy." *J Cell Sci* **118**(Pt 8): 1549-1558.
- D'Avino, P. P., T. Takeda, et al. (2008). "Interaction between Anillin and RacGAP50C connects the actomyosin contractile ring with spindle microtubules at the cell division site." *J Cell Sci* **121**(Pt 8): 1151-1158.
- Dai, D., Y. Liang, et al. (2012). "Survivin deficiency induces apoptosis and cell cycle arrest in HepG2 hepatocellular carcinoma cells." *Oncol Rep* **27**(3): 621-627.
- Dandri, M., P. Schirmacher, et al. (1996). "Woodchuck hepatitis virus X protein is present in chronically infected woodchuck liver and woodchuck hepatocellular carcinomas which are permissive for viral replication." *J Virol* **70**(8): 5246-5254.
- Dane, D. S., C. H. Cameron, et al. (1970). "Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis." *Lancet* **1**(7649): 695-698.
- Das, K., X. Xiong, et al. (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.
- Datta, S., A. Banerjee, et al. (2008). "Analysis of hepatitis B virus X gene phylogeny, genetic variability and its impact on pathogenesis: implications in Eastern Indian HBV carriers." *Virology* **382**(2): 190-198.
- Daub, H., S. Blencke, et al. (2002). "Identification of SRPK1 and SRPK2 as the major cellular protein kinases phosphorylating hepatitis B virus core protein." *J Virol* **76**(16): 8124-8137.
- Davis, G. L., J. E. Albright, et al. (2003). "Projecting future complications of chronic hepatitis C in the United States." *Liver Transpl* **9**(4): 331-338.
- Davoli, T. and T. de Lange (2011). "The causes and consequences of polyploidy in normal development and cancer." *Annu Rev Cell Dev Biol* **27**: 585-610.
- Davoli, T. and T. de Lange (2012). "Telomere-driven tetraploidization occurs in human cells undergoing crisis and promotes transformation of mouse cells." *Cancer Cell* **21**(6): 765-776.
- Davoli, T., E. L. Denchi, et al. (2010). "Persistent telomere damage induces bypass of mitosis and tetraploidy." *Cell* **141**(1): 81-93.
- de La Coste, A., B. Romagnolo, et al. (1998). "Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(15): 8847-8851.

- Dean, S. O., S. L. Rogers, et al. (2005). "Distinct pathways control recruitment and maintenance of myosin II at the cleavage furrow during cytokinesis." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(38): 13473-13478.
- Decorsiere, A., H. Mueller, et al. (2016). "Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor." Nature **531**(7594): 386-389.
- Degertekin, B. and A. S. Lok (2009). "Indications for therapy in hepatitis B." Hepatology **49**(5 Suppl): S129-137.
- Dejean, A., L. Bougueleret, et al. (1986). "Hepatitis B virus DNA integration in a sequence homologous to v-erb-A and steroid receptor genes in a hepatocellular carcinoma." Nature **322**(6074): 70-72.
- Delaney, W. E. t., H. Yang, et al. (2003). "The hepatitis B virus polymerase mutation rtV173L is selected during lamivudine therapy and enhances viral replication in vitro." J Virol **77**(21): 11833-11841.
- Delire, B., P. Starkel, et al. (2015). "Animal Models for Fibrotic Liver Diseases: What We Have, What We Need, and What Is under Development." J Clin Transl Hepatol **3**(1): 53-66.
- DeNicola, G. M., F. A. Karreth, et al. (2011). "Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis." Nature **475**(7354): 106-109.
- DePamphilis, M. L. (2005). "Cell cycle dependent regulation of the origin recognition complex." Cell Cycle **4**(1): 70-79.
- Der, S. D., A. Zhou, et al. (1998). "Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15623-15628.
- Diab, A. M., A. Foca, et al. (2017). "Polo-like-kinase 1 is a proviral host-factor for hepatitis B virus replication." Hepatology.
- Diffley, J. F. (1996). "Once and only once upon a time: specifying and regulating origins of DNA replication in eukaryotic cells." Genes Dev **10**(22): 2819-2830.
- Dikovskaya, D., D. Schiffmann, et al. (2007). "Loss of APC induces polyploidy as a result of a combination of defects in mitosis and apoptosis." J Cell Biol **176**(2): 183-195.
- Dimri, G. P. and J. Campisi (1994). "Molecular and cell biology of replicative senescence." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **59**: 67-73.
- Dimri, G. P., X. Lee, et al. (1995). "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(20): 9363-9367.
- Douville, E. and J. Downward (1997). "EGF induced SOS phosphorylation in PC12 cells involves P90 RSK-2." Oncogene **15**(4): 373-383.
- Du, Y., G. Kong, et al. (2012). "Elevation of highly up-regulated in liver cancer (HULC) by hepatitis B virus X protein promotes hepatoma cell proliferation via down-regulating p18." J Biol Chem **287**(31): 26302-26311.
- Duelli, D. and Y. Lazebnik (2007). "Cell-to-cell fusion as a link between viruses and cancer." Nat Rev Cancer **7**(12): 968-976.
- Dumortier, J., K. Schonig, et al. (2005). "Liver-specific expression of interferon gamma following adenoviral gene transfer controls hepatitis B virus replication in mice." Gene Ther **12**(8): 668-677.

- Duncan, A. W. (2013). "Aneuploidy, polyploidy and ploidy reversal in the liver." Semin Cell Dev Biol **24**(4): 347-356.
- Duncan, A. W., A. E. Hanlon Newell, et al. (2012). "Frequent aneuploidy among normal human hepatocytes." Gastroenterology **142**(1): 25-28.
- Duncan, A. W., M. H. Taylor, et al. (2010). "The ploidy conveyor of mature hepatocytes as a source of genetic variation." Nature **467**(7316): 707-710.
- Duncker, B. P., I. N. Chesnokov, et al. (2009). "The origin recognition complex protein family." Genome Biol **10**(3): 214.
- Dunn, C., D. Peppas, et al. (2009). "Temporal analysis of early immune responses in patients with acute hepatitis B virus infection." Gastroenterology **137**(4): 1289-1300.
- Duriez, M., Y. Mandouri, et al. (2017). "Alternative splicing of hepatitis B virus: A novel virus/host interaction altering liver immunity." J Hepatol.
- Duriez, M., J. M. Rossignol, et al. (2008). "The hepatitis B virus precore protein is retrotransported from endoplasmic reticulum (ER) to cytosol through the ER-associated degradation pathway." J Biol Chem **283**(47): 32352-32360.
- Eckhardt, S. G., D. R. Milich, et al. (1991). "Hepatitis B virus core antigen has two nuclear localization sequences in the arginine-rich carboxyl terminus." J Virol **65**(2): 575-582.
- Edman, J. C., P. Gray, et al. (1980). "Integration of hepatitis B virus sequences and their expression in a human hepatoma cell." Nature **286**(5772): 535-538.
- Ekstedt, M., L. E. Franzen, et al. (2006). "Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes." Hepatology **44**(4): 865-873.
- El-Sayed, S. S., M. El-Sadany, et al. (2004). "DNA ploidy and liver cell dysplasia in liver biopsies from patients with liver cirrhosis." Can J Gastroenterol **18**(2): 87-91.
- El-Serag, H. B. (2011). "Hepatocellular carcinoma." N Engl J Med **365**(12): 1118-1127.
- El-Serag, H. B. (2012). "Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma." Gastroenterology **142**(6): 1264-1273 e1261.
- El-Serag, H. B. and K. L. Rudolph (2007). "Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis." Gastroenterology **132**(7): 2557-2576.
- Eliades, A., N. Papadantonakis, et al. (2010). "New roles for cyclin E in megakaryocytic polyploidization." J Biol Chem **285**(24): 18909-18917.
- Elinger, S. (2014). "HBV: Stowaway of NTCP." Clin Res Hepatol Gastroenterol **38**(6): 661-663.
- Engel, F. B., M. Schebesta, et al. (2006). "Anillin localization defect in cardiomyocyte binucleation." J Mol Cell Cardiol **41**(4): 601-612.
- Engel, M. E., M. A. McDonnell, et al. (1999). "Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription." J Biol Chem **274**(52): 37413-37420.
- Epstein, C. J. (1967). "Cell size, nuclear content, and the development of polyploidy in the Mammalian liver." Proc Natl Acad Sci U S A **57**(2): 327-334.
- Faivre, J., M. Frank-Vaillant, et al. (2002). "Centrosome overduplication, increased ploidy and transformation in cells expressing endoplasmic reticulum-associated cyclin A2." Oncogene **21**(10): 1493-1500.
- Farazi, P. A. and R. A. DePinho (2006). "Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment." Nat Rev Cancer **6**(9): 674-687.

- Farber, E. and D. S. Sarma (1987). "Hepatocarcinogenesis: a dynamic cellular perspective." Lab Invest **56**(1): 4-22.
- Fares, M. A., K. P. Byrne, et al. (2006). "Rate asymmetry after genome duplication causes substantial long-branch attraction artifacts in the phylogeny of *Saccharomyces* species." Mol Biol Evol **23**(2): 245-253.
- Faure-Dupuy, S., J. Lucifora, et al. (2017). "Interplay between the Hepatitis B Virus and Innate Immunity: From an Understanding to the Development of Therapeutic Concepts." Viruses **9**(5).
- Feitelson, M. A., M. M. Clayton, et al. (1990). "Monoclonal antibodies raised to purified woodchuck hepatitis virus core antigen particles demonstrate X antigen reactivity." Virology **177**(1): 357-366.
- Feitelson, M. A., M. Zhu, et al. (1993). "Hepatitis B x antigen and p53 are associated in vitro and in liver tissues from patients with primary hepatocellular carcinoma." Oncogene **8**(5): 1109-1117.
- Feng, G. X., J. Li, et al. (2017). "Hepatitis B virus X protein promotes the development of liver fibrosis and hepatoma through downregulation of miR-30e targeting P4HA2 mRNA." Oncogene.
- Feray, C., A. L. Zignego, et al. (1990). "Persistent hepatitis B virus infection of mononuclear blood cells without concomitant liver infection. The liver transplantation model." Transplantation **49**(6): 1155-1158.
- Ferber, M. J., D. P. Montoya, et al. (2003). "Integrations of the hepatitis B virus (HBV) and human papillomavirus (HPV) into the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene in liver and cervical cancers." Oncogene **22**(24): 3813-3820.
- Fernholz, D., M. Stemler, et al. (1991). "Replicating and virion secreting hepatitis B mutant virus unable to produce preS2 protein." J Hepatol **13 Suppl 4**: S102-104.
- Fisicaro, P., C. Valdatta, et al. (2009). "Early kinetics of innate and adaptive immune responses during hepatitis B virus infection." Gut **58**(7): 974-982.
- Fodde, R., J. Kuipers, et al. (2001). "Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability." Nat Cell Biol **3**(4): 433-438.
- Folkman, J. (1995). "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease." Nat Med **1**(1): 27-31.
- Forgues, M., M. J. Difilippantonio, et al. (2003). "Involvement of Crm1 in hepatitis B virus X protein-induced aberrant centriole replication and abnormal mitotic spindles." Mol Cell Biol **23**(15): 5282-5292.
- Forgues, M., A. J. Marrogi, et al. (2001). "Interaction of the hepatitis B virus X protein with the Crm1-dependent nuclear export pathway." J Biol Chem **276**(25): 22797-22803.
- Fox, D. T. and R. J. Duronio (2013). "Endoreplication and polyploidy: insights into development and disease." Development **140**(1): 3-12.
- Friedberg, E. C. (2003). "DNA damage and repair." Nature **421**(6921): 436-440.
- Friedman, S. L. (2008). "Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver." Physiol Rev **88**(1): 125-172.
- Friedman, S. L. and M. J. Arthur (1989). "Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. Direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell

- proliferation via induction of platelet-derived growth factor receptors." J Clin Invest **84**(6): 1780-1785.
- Fry, A. M. and A. J. Faragher (2001). "Identification of centrosome kinases." Methods Cell Biol **67**: 305-323.
- Fujii, R., C. Zhu, et al. (2006). "HBXIP, cellular target of hepatitis B virus oncoprotein, is a regulator of centrosome dynamics and cytokinesis." Cancer Res **66**(18): 9099-9107.
- Fujimoto, A., M. Furuta, et al. (2015). "Whole-genome mutational landscape of liver cancers displaying biliary phenotype reveals hepatitis impact and molecular diversity." Nat Commun **6**: 6120.
- Fujimoto, A., Y. Totoki, et al. (2012). "Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators." Nat Genet **44**(7): 760-764.
- Fujiwara, T., M. Bandi, et al. (2005). "Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells." Nature **437**(7061): 1043-1047.
- Gaggar, A., C. Coeshott, et al. (2014). "Safety, tolerability and immunogenicity of GS-4774, a hepatitis B virus-specific therapeutic vaccine, in healthy subjects: a randomized study." Vaccine **32**(39): 4925-4931.
- Galitski, T., A. J. Saldanha, et al. (1999). "Ploidy regulation of gene expression." Science **285**(5425): 251-254.
- Gallardo, M. H., J. W. Bickham, et al. (1999). "Discovery of tetraploidy in a mammal." Nature **401**(6751): 341.
- Gallardo, M. H., C. A. Gonzalez, et al. (2006). "Molecular cytogenetics and allotetraploidy in the red vizcacha rat, *Tympanoctomys barrerae* (Rodentia, Octodontidae)." Genomics **88**(2): 214-221.
- Gallina, A., F. Bonelli, et al. (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.
- Gandarillas, A. and A. Freije (2014). "Cycling up the epidermis: reconciling 100 years of debate." Exp Dermatol **23**(2): 87-91.
- Gandillet, A., E. Alexandre, et al. (2003). "Hepatocyte ploidy in normal young rat." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **134**(3): 665-673.
- Ganem, D. (1991). "Assembly of hepadnaviral virions and subviral particles." Curr Top Microbiol Immunol **168**: 61-83.
- Ganem, N. J., S. A. Godinho, et al. (2009). "A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability." Nature **460**(7252): 278-282.
- Ganem, N. J., Z. Storchova, et al. (2007). "Tetraploidy, aneuploidy and cancer." Curr Opin Genet Dev **17**(2): 157-162.
- Gao, B. and R. Bataller (2011). "Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets." Gastroenterology **141**(5): 1572-1585.
- Gao, F., X. Sun, et al. (2015). "Downregulation of MicroRNA-145 Caused by Hepatitis B Virus X Protein Promotes Expression of CUL5 and Contributes to Pathogenesis of Hepatitis B Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma." Cell Physiol Biochem **37**(4): 1547-1559.

- Gao, P. and J. Zheng (2011). "Oncogenic virus-mediated cell fusion: new insights into initiation and progression of oncogenic viruses--related cancers." *Cancer Lett* **303**(1): 1-8.
- Gao, Y., E. Smith, et al. (2012). "Role of RhoA-specific guanine exchange factors in regulation of endomitosis in megakaryocytes." *Dev Cell* **22**(3): 573-584.
- Garcia-Fulgueiras, A., R. Garcia-Pina, et al. (2009). "Hepatitis C and hepatitis B-related mortality in Spain." *Eur J Gastroenterol Hepatol* **21**(8): 895-901.
- Garcia, M., H. de The, et al. (1993). "A hepatitis B virus pre-S-retinoic acid receptor beta chimera transforms erythrocytic progenitor cells in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(1): 89-93.
- Gazina, E. V., J. E. Fielding, et al. (2000). "Core protein phosphorylation modulates pregenomic RNA encapsidation to different extents in human and duck hepatitis B viruses." *J Virol* **74**(10): 4721-4728.
- Gearhart, T. L. and M. J. Bouchard (2010). "Replication of the hepatitis B virus requires a calcium-dependent HBx-induced G1 phase arrest of hepatocytes." *Virology* **407**(1): 14-25.
- Gearhart, T. L. and M. J. Bouchard (2011). "The hepatitis B virus HBx protein modulates cell cycle regulatory proteins in cultured primary human hepatocytes." *Virus Res* **155**(1): 363-367.
- Geng, X., B. L. Harry, et al. (2012). "Hepatitis B virus X protein targets the Bcl-2 protein CED-9 to induce intracellular Ca²⁺ increase and cell death in *Caenorhabditis elegans*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(45): 18465-18470.
- Gentric, G. and C. Desdouets (2014). "Polyploidization in liver tissue." *Am J Pathol* **184**(2): 322-331.
- Gentric, G. and C. Desdouets (2015). "Liver polyploidy: Dr Jekyll or Mr Hide?" *Oncotarget* **6**(11): 8430-8431.
- Gentric, G., V. Maillet, et al. (2015). "Oxidative stress promotes pathologic polyploidization in nonalcoholic fatty liver disease." *J Clin Invest* **125**(3): 981-992.
- Gerlyng, P., A. Abyholm, et al. (1993). "Binucleation and polyploidization patterns in developmental and regenerative rat liver growth." *Cell Prolif* **26**(6): 557-565.
- Giannelli, G., P. Koudelkova, et al. (2016). "Role of epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma." *J Hepatol* **65**(4): 798-808.
- Giehl, M., A. Fabarius, et al. (2005). "Centrosome aberrations in chronic myeloid leukemia correlate with stage of disease and chromosomal instability." *Leukemia* **19**(7): 1192-1197.
- Gish, R. G., B. D. Given, et al. (2015). "Chronic hepatitis B: Virology, natural history, current management and a glimpse at future opportunities." *Antiviral Res* **121**: 47-58.
- Gish, R. G., M. F. Yuen, et al. (2015). "Synthetic RNAi triggers and their use in chronic hepatitis B therapies with curative intent." *Antiviral Res* **121**: 97-108.
- Glebe, D. and S. Urban (2007). "Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry." *World J Gastroenterol* **13**(1): 22-38.
- Gong, D. Y., E. Q. Chen, et al. (2013). "Role and functional domain of hepatitis B virus X protein in regulating HBV transcription and replication in vitro and in vivo." *Viruses* **5**(5): 1261-1271.
- Gorla, G. R., H. Malhi, et al. (2001). "Polyploidy associated with oxidative injury attenuates proliferative potential of cells." *J Cell Sci* **114**(Pt 16): 2943-2951.
- Gouas, D., H. Shi, et al. (2009). "The aflatoxin-induced TP53 mutation at codon 249 (R249S): biomarker of exposure, early detection and target for therapy." *Cancer Lett* **286**(1): 29-37.

- Gozuacik, D., Y. Murakami, et al. (2001). "Identification of human cancer-related genes by naturally occurring Hepatitis B Virus DNA tagging." *Oncogene* **20**(43): 6233-6240.
- Gramantieri, L., M. Ferracin, et al. (2007). "Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma." *Cancer Res* **67**(13): 6092-6099.
- Gramantieri, L., C. Melchiorri, et al. (1996). "Alteration of DNA ploidy and cell nuclearity in human hepatocellular carcinoma associated with HBV infection." *J Hepatol* **25**(6): 848-853.
- Gregory, S. L., S. Ebrahimi, et al. (2008). "Cell division requires a direct link between microtubule-bound RacGAP and Anillin in the contractile ring." *Curr Biol* **18**(1): 25-29.
- Groisman, I. J., R. Koshy, et al. (1999). "Downregulation of DNA excision repair by the hepatitis B virus-x protein occurs in p53-proficient and p53-deficient cells." *Carcinogenesis* **20**(3): 479-483.
- Guertin, D. A., S. Trautmann, et al. (2002). "Cytokinesis in eukaryotes." *Microbiol Mol Biol Rev* **66**(2): 155-178.
- Guicciardi, M. E. and G. J. Gores (2010). "Apoptosis as a mechanism for liver disease progression." *Semin Liver Dis* **30**(4): 402-410.
- Guichard, C., G. Amaddeo, et al. (2012). "Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma." *Nat Genet* **44**(6): 694-698.
- Guidotti, J. E., O. Bregerie, et al. (2003). "Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes." *J Biol Chem* **278**(21): 19095-19101.
- Guidotti, L. G., R. Rochford, et al. (1999). "Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection." *Science* **284**(5415): 825-829.
- Gunes, C. and K. L. Rudolph (2013). "The role of telomeres in stem cells and cancer." *Cell* **152**(3): 390-393.
- Gunther, S., L. Fischer, et al. (1999). "Naturally occurring variants of hepatitis B virus." *Adv Virus Res* **52**: 25-137.
- Gunther, S., G. Sommer, et al. (1997). "Heterogeneity and common features of defective hepatitis B virus genomes derived from spliced pregenomic RNA." *Virology* **238**(2): 363-371.
- Guo, G. H., D. M. Tan, et al. (2009). "Hepatitis B virus X protein promotes proliferation and upregulates TGF-beta1 and CTGF in human hepatic stellate cell line, LX-2." *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* **8**(1): 59-64.
- Gupta, S. (2000). "Hepatic polyploidy and liver growth control." *Semin Cancer Biol* **10**(3): 161-171.
- Guse, A., M. Mishima, et al. (2005). "Phosphorylation of ZEN-4/MKLP1 by aurora B regulates completion of cytokinesis." *Curr Biol* **15**(8): 778-786.
- Guyot, C., S. Lepreux, et al. (2006). "Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo)fibroblastic cell subpopulations involved." *Int J Biochem Cell Biol* **38**(2): 135-151.
- Hakami, A., A. Ali, et al. (2013). "Effects of hepatitis B virus mutations on its replication and liver disease severity." *Open Virol J* **7**: 12-18.
- Hakvoort, T. B., Y. He, et al. (2017). "Pivotal role of glutamine synthetase in ammonia detoxification." *Hepatology* **65**(1): 281-293.

- Halfon, P., S. Pol, et al. (2002). "[Hepatitis B virus genotypes: clinical, epidemiological and therapeutic implications]." Gastroenterol Clin Biol **26**(11): 1005-1012.
- Hamamoto, R., F. P. Silva, et al. (2006). "Enhanced SMYD3 expression is essential for the growth of breast cancer cells." Cancer Sci **97**(2): 113-118.
- Hammerich, L., F. Heymann, et al. (2011). "Role of IL-17 and Th17 cells in liver diseases." Clin Dev Immunol **2011**: 345803.
- Han, Y. P. (2006). "Matrix metalloproteinases, the pros and cons, in liver fibrosis." J Gastroenterol Hepatol **21 Suppl 3**: S88-91.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
- Harada, N., H. Miyoshi, et al. (2002). "Lack of tumorigenesis in the mouse liver after adenovirus-mediated expression of a dominant stable mutant of beta-catenin." Cancer Res **62**(7): 1971-1977.
- Harbour, J. W., R. X. Luo, et al. (1999). "Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1." Cell **98**(6): 859-869.
- Hartmann-Stuhler, C. and R. Prange (2001). "Hepatitis B virus large envelope protein interacts with gamma2-adaptin, a clathrin adaptor-related protein." J Virol **75**(11): 5343-5351.
- Haussinger, D. and F. Schliess (2007). "Glutamine metabolism and signaling in the liver." Front Biosci **12**: 371-391.
- He, G., G. Y. Yu, et al. (2010). "Hepatocyte IKKbeta/NF-kappaB inhibits tumor promotion and progression by preventing oxidative stress-driven STAT3 activation." Cancer Cell **17**(3): 286-297.
- He, J., K. Zhao, et al. (2015). "Upregulation of microRNA-122 by farnesoid X receptor suppresses the growth of hepatocellular carcinoma cells." Mol Cancer **14**: 163.
- He, Z. L., H. Zheng, et al. (2009). "Overexpression of polo-like kinase1 predicts a poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients." World J Gastroenterol **15**(33): 4177-4182.
- Heathcote, J. (2003). "Treatment of HBe antigen-positive chronic hepatitis B." Semin Liver Dis **23**(1): 69-80.
- Heermann, K. H., U. Goldmann, et al. (1984). "Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence." J Virol **52**(2): 396-402.
- Heindryckx, F., I. Colle, et al. (2009). "Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research." Int J Exp Pathol **90**(4): 367-386.
- Hellerbrand, C., B. Stefanovic, et al. (1999). "The role of TGFbeta1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo." J Hepatol **30**(1): 77-87.
- Henkler, F., J. Hoare, et al. (2001). "Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein." J Gen Virol **82**(Pt 4): 871-882.
- Hernandez-Gea, V. and S. L. Friedman (2011). "Pathogenesis of liver fibrosis." Annu Rev Pathol **6**: 425-456.

- Hernandez-Gea, V., Z. Ghiassi-Nejad, et al. (2012). "Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues." Gastroenterology **142**(4): 938-946.
- Hernandez-Gea, V., M. Hilscher, et al. (2013). "Endoplasmic reticulum stress induces fibrogenic activity in hepatic stellate cells through autophagy." J Hepatol **59**(1): 98-104.
- Hickson, G. R., A. Echard, et al. (2006). "Rho-kinase controls cell shape changes during cytokinesis." Curr Biol **16**(4): 359-370.
- Hinchcliffe, E. H., C. Li, et al. (1999). "Requirement of Cdk2-cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in *Xenopus* egg extracts." Science **283**(5403): 851-854.
- Hirata, M., S. M. Akbar, et al. (2001). "Noninvasive diagnosis of the degree of hepatic fibrosis using ultrasonography in patients with chronic liver disease due to hepatitis C virus." Eur J Clin Invest **31**(6): 528-535.
- Hixon, M. L., C. Obejero-Paz, et al. (2000). "Cks1 mediates vascular smooth muscle cell polyploidization." J Biol Chem **275**(51): 40434-40442.
- Hoegg, S. and A. Meyer (2005). "Hox clusters as models for vertebrate genome evolution." Trends Genet **21**(8): 421-424.
- Holczbauer, A., V. M. Factor, et al. (2013). "Modeling pathogenesis of primary liver cancer in lineage-specific mouse cell types." Gastroenterology **145**(1): 221-231.
- Hong, Y., L. Zhou, et al. (2015). "Innate immune evasion by hepatitis B virus-mediated downregulation of TRIF." Biochem Biophys Res Commun **463**(4): 719-725.
- Horiike, N., B. S. Blumberg, et al. (1991). "Characteristics of hepatitis B X antigen, antibodies to X antigen, and antibodies to the viral polymerase during hepatitis B virus infection." J Infect Dis **164**(6): 1104-1112.
- Hoshida, Y., S. M. Nijman, et al. (2009). "Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma." Cancer Res **69**(18): 7385-7392.
- Hou, G., R. Dick, et al. (2009). "Improvement in dissolution of liver fibrosis in an animal model by tetrathiomolybdate." Exp Biol Med (Maywood) **234**(6): 662-665.
- Hsu, I. C., R. A. Metcalf, et al. (1991). "Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas." Nature **350**(6317): 427-428.
- Hsu, S. H., E. R. Delgado, et al. (2016). "MicroRNA-122 regulates polyploidization in the murine liver." Hepatology **64**(2): 599-615.
- Hu, L. and B. P. Ceresa (2009). "Characterization of the plasma membrane localization and orientation of HPV16 E5 for cell-cell fusion." Virology **393**(1): 135-143.
- Hu, T. H., C. C. Huang, et al. (2003). "Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 in hepatocellular carcinoma." Cancer **97**(8): 1929-1940.
- Hu, Z., Z. Zhang, et al. (1999). "Hepatitis B virus X protein is both a substrate and a potential inhibitor of the proteasome complex." J Virol **73**(9): 7231-7240.
- Huang, H. C., C. C. Chen, et al. (2012). "Entry of hepatitis B virus into immortalized human primary hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis." J Virol **86**(17): 9443-9453.
- Huang, J., J. Kwong, et al. (1996). "Proteasome complex as a potential cellular target of hepatitis B virus X protein." J Virol **70**(8): 5582-5591.

- Huang, J. F., Y. J. Guo, et al. (2013). "Hepatitis B virus X protein (HBx)-related long noncoding RNA (lncRNA) down-regulated expression by HBx (Dreh) inhibits hepatocellular carcinoma metastasis by targeting the intermediate filament protein vimentin." *Hepatology* **57**(5): 1882-1892.
- Huang, J. L., T. Y. Ren, et al. (2015). "HBx-related long non-coding RNA DBH-AS1 promotes cell proliferation and survival by activating MAPK signaling in hepatocellular carcinoma." *Oncotarget* **6**(32): 33791-33804.
- Huang, S., A. Sirikhachornkit, et al. (2002). "Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the Triticum/Aegilops complex and the evolutionary history of polyploid wheat." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(12): 8133-8138.
- Hui, L., L. Bakiri, et al. (2007). "p38alpha suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK-c-Jun pathway." *Nat Genet* **39**(6): 741-749.
- Hui, L., L. Bakiri, et al. (2007). "p38alpha: a suppressor of cell proliferation and tumorigenesis." *Cell Cycle* **6**(20): 2429-2433.
- Hui, L., K. Zatloukal, et al. (2008). "Proliferation of human HCC cells and chemically induced mouse liver cancers requires JNK1-dependent p21 downregulation." *J Clin Invest* **118**(12): 3943-3953.
- Huynh, H., P. K. Chow, et al. (2007). "AZD6244 and doxorubicin induce growth suppression and apoptosis in mouse models of hepatocellular carcinoma." *Mol Cancer Ther* **6**(9): 2468-2476.
- Huynh, H., K. C. Soo, et al. (2007). "Targeted inhibition of the extracellular signal-regulated kinase pathway with AZD6244 (ARRY-142886) in the treatment of hepatocellular carcinoma." *Mol Cancer Ther* **6**(1): 138-146.
- Incassati, A., D. Patel, et al. (2006). "Induction of tetraploidy through loss of p53 and upregulation of Plk1 by human papillomavirus type-16 E6." *Oncogene* **25**(17): 2444-2451.
- Iwaisako, K., C. Jiang, et al. (2014). "Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(32): E3297-3305.
- Jacob, J. R., A. Sterczer, et al. (2004). "Integration of woodchuck hepatitis and N-myc rearrangement determine size and histologic grade of hepatic tumors." *Hepatology* **39**(4): 1008-1016.
- Jafri, S. M. and A. S. Lok (2010). "Antiviral therapy for chronic hepatitis B." *Clin Liver Dis* **14**(3): 425-438.
- Jalan, R., F. De Chiara, et al. (2016). "Ammonia produces pathological changes in human hepatic stellate cells and is a target for therapy of portal hypertension." *J Hepatol* **64**(4): 823-833.
- Jang, J. W., J. Y. Chun, et al. (2012). "Mutational complex genotype of the hepatitis B virus X /precore regions as a novel predictive marker for hepatocellular carcinoma." *Cancer Sci* **103**(2): 296-304.
- Ji, J., J. Shi, et al. (2009). "MicroRNA expression, survival, and response to interferon in liver cancer." *N Engl J Med* **361**(15): 1437-1447.
- Jiang, W., G. Jimenez, et al. (1998). "PRC1: a human mitotic spindle-associated CDK substrate protein required for cytokinesis." *Mol Cell* **2**(6): 877-885.
- Jiang, Z., S. Jhunjhunwala, et al. (2012). "The effects of hepatitis B virus integration into the genomes of hepatocellular carcinoma patients." *Genome Res* **22**(4): 593-601.

- Jiao, Y., N. J. Wickett, et al. (2011). "Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms." *Nature* **473**(7345): 97-100.
- Jin, Z., R. Sun, et al. (2011). "Accelerated liver fibrosis in hepatitis B virus transgenic mice: involvement of natural killer T cells." *Hepatology* **53**(1): 219-229.
- Jury, E. (2003). "EASL International Consensus Conference on Hepatitis B. 13-14 September, 2002: Geneva, Switzerland. Consensus statement (short version)." *J Hepatol* **38**(4): 533-540.
- Kamada, Y., S. Tamura, et al. (2003). "Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin." *Gastroenterology* **125**(6): 1796-1807.
- Kandpal, M., J. Samal, et al. (2015). "Enhanced hepatitis B virus (HBV) pre-genomic RNA levels and higher transcription efficiency of defective HBV genomes." *J Gen Virol* **96**(10): 3109-3117.
- Kaneko, M., T. Uchida, et al. (1995). "Probable implication of mutations of the X open reading frame in the onset of fulminant hepatitis B." *J Med Virol* **47**(3): 204-208.
- Kann, M., A. Schmitz, et al. (2007). "Intracellular transport of hepatitis B virus." *World J Gastroenterol* **13**(1): 39-47.
- Kann, M., B. Sodeik, et al. (1999). "Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex." *J Cell Biol* **145**(1): 45-55.
- Kann, M., R. Thomssen, et al. (1993). "Characterization of the endogenous protein kinase activity of the hepatitis B virus." *Arch Virol Suppl* **8**: 53-62.
- Kao, J. H., P. J. Chen, et al. (2004). "Hepatitis B virus genotypes and spontaneous hepatitis B e antigen seroconversion in Taiwanese hepatitis B carriers." *J Med Virol* **72**(3): 363-369.
- Kaplan, K. B., A. A. Burds, et al. (2001). "A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation." *Nat Cell Biol* **3**(4): 429-432.
- Kaplan, P. M., R. L. Greenman, et al. (1973). "DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen." *J Virol* **12**(5): 995-1005.
- Kau, J. H. and L. P. Ting (1998). "Phosphorylation of the core protein of hepatitis B virus by a 46-kilodalton serine kinase." *J Virol* **72**(5): 3796-3803.
- Kay, A., E. Mandart, et al. (1985). "The HBV HBX gene expressed in E. coli is recognised by sera from hepatitis patients." *EMBO J* **4**(5): 1287-1292.
- Keasler, V. V., A. J. Hodgson, et al. (2007). "Enhancement of hepatitis B virus replication by the regulatory X protein in vitro and in vivo." *J Virol* **81**(6): 2656-2662.
- Keng, V. W., D. Sia, et al. (2013). "Sex bias occurrence of hepatocellular carcinoma in Poly7 molecular subclass is associated with EGFR." *Hepatology* **57**(1): 120-130.
- Kidd-Ljunggren, K., M. Oberg, et al. (1995). "The hepatitis B virus X gene: analysis of functional domain variation and gene phylogeny using multiple sequences." *J Gen Virol* **76** (Pt 9): 2119-2130.
- Kim, C. W., S. K. Yoon, et al. (2007). "Correlation of hepatitis B core antigen and beta-catenin expression on hepatocytes in chronic hepatitis B virus infection: relevance to the severity of liver damage and viral replication." *J Gastroenterol Hepatol* **22**(9): 1534-1542.
- Kim, H., H. Lee, et al. (1998). "X-gene product of hepatitis B virus induces apoptosis in liver cells." *J Biol Chem* **273**(1): 381-385.

- Kim, H. J., S. Y. Kim, et al. (2008). "Hepatitis B virus X protein induces apoptosis by enhancing translocation of Bax to mitochondria." *IUBMB Life* **60**(7): 473-480.
- Kim, H. J., J. H. Park, et al. (2008). "Hepatitis B virus X mutations occurring naturally associated with clinical severity of liver disease among Korean patients with chronic genotype C infection." *J Med Virol* **80**(8): 1337-1343.
- Kim, J. Y., E. H. Song, et al. (2010). "HBx-induced hepatic steatosis and apoptosis are regulated by TNFR1- and NF-kappaB-dependent pathways." *J Mol Biol* **397**(4): 917-931.
- Kim, K. H. and B. L. Seong (2003). "Pro-apoptotic function of HBV X protein is mediated by interaction with c-FLIP and enhancement of death-inducing signal." *EMBO J* **22**(9): 2104-2116.
- Kim, K. H., H. J. Shin, et al. (2007). "Hepatitis B virus X protein induces hepatic steatosis via transcriptional activation of SREBP1 and PPARgamma." *Gastroenterology* **132**(5): 1955-1967.
- Kim, R. S., D. Hasegawa, et al. (2016). "The XBP1 Arm of the Unfolded Protein Response Induces Fibrogenic Activity in Hepatic Stellate Cells Through Autophagy." *Sci Rep* **6**: 39342.
- Kim, S., H. S. Lee, et al. (2015). "Hepatitis B virus X protein activates the ATM-Chk2 pathway and delays cell cycle progression." *J Gen Virol* **96**(8): 2242-2251.
- Kim, S. U., Y. S. Seo, et al. (2010). "Factors that affect the diagnostic accuracy of liver fibrosis measurement by Fibroscan in patients with chronic hepatitis B." *Aliment Pharmacol Ther* **32**(3): 498-505.
- Kimbi, G. C., A. Kramvis, et al. (2005). "Integration of hepatitis B virus DNA into chromosomal DNA during acute hepatitis B." *World J Gastroenterol* **11**(41): 6416-6421.
- Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1996). "Life (and death) in a malignant tumour." *Nature* **379**(6560): 19-20.
- Kishimoto, T. (2015). "Entry into mitosis: a solution to the decades-long enigma of MPF." *Chromosoma* **124**(4): 417-428.
- Klein, N. P., M. J. Bouchard, et al. (1999). "Src kinases involved in hepatitis B virus replication." *EMBO J* **18**(18): 5019-5027.
- Kleiner, D. E., E. M. Brunt, et al. (2005). "Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease." *Hepatology* **41**(6): 1313-1321.
- Klocker, U., U. Schultz, et al. (2000). "Endotoxin stimulates liver macrophages to release mediators that inhibit an early step in hepadnavirus replication." *J Virol* **74**(12): 5525-5533.
- Kluwe, J., J. P. Pradere, et al. (2010). "Modulation of hepatic fibrosis by c-Jun-N-terminal kinase inhibition." *Gastroenterology* **138**(1): 347-359.
- Kluwe, J., N. Wongsiriroj, et al. (2011). "Absence of hepatic stellate cell retinoid lipid droplets does not enhance hepatic fibrosis but decreases hepatic carcinogenesis." *Gut* **60**(9): 1260-1268.
- Kocabayoglu, P., A. Lade, et al. (2015). "beta-PDGF receptor expressed by hepatic stellate cells regulates fibrosis in murine liver injury, but not carcinogenesis." *J Hepatol* **63**(1): 141-147.
- Kochanski, R. S. and G. G. Borisy (1990). "Mode of centriole duplication and distribution." *J Cell Biol* **110**(5): 1599-1605.
- Kong, G., J. Zhang, et al. (2011). "Upregulated microRNA-29a by hepatitis B virus X protein enhances hepatoma cell migration by targeting PTEN in cell culture model." *PLoS One* **6**(5): e19518.

- Kong, X., D. Feng, et al. (2012). "Interleukin-22 induces hepatic stellate cell senescence and restricts liver fibrosis in mice." *Hepatology* **56**(3): 1150-1159.
- Koniger, C., I. Wingert, et al. (2014). "Involvement of the host DNA-repair enzyme TDP2 in formation of the covalently closed circular DNA persistence reservoir of hepatitis B viruses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(40): E4244-4253.
- Koo, J. H., H. J. Lee, et al. (2016). "Endoplasmic Reticulum Stress in Hepatic Stellate Cells Promotes Liver Fibrosis via PERK-Mediated Degradation of HNRNPA1 and Up-regulation of SMAD2." *Gastroenterology* **150**(1): 181-193 e188.
- Korba, B. E., P. J. Cote, et al. (1989). "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.
- Koshy, R., P. Maupas, et al. (1981). "Detection of hepatitis B virus-specific DNA in the genomes of human hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis tissues." *J Gen Virol* **57**(Pt 1): 95-102.
- Kroboth, K., I. P. Newton, et al. (2007). "Lack of adenomatous polyposis coli protein correlates with a decrease in cell migration and overall changes in microtubule stability." *Mol Biol Cell* **18**(3): 910-918.
- Kronenberger, B., I. Rudloff, et al. (2012). "Interleukin-22 predicts severity and death in advanced liver cirrhosis: a prospective cohort study." *BMC Med* **10**: 102.
- Kronenwett, U., S. Huwendiek, et al. (2005). "Characterisation of breast fine-needle aspiration biopsies by centrosome aberrations and genomic instability." *Br J Cancer* **92**(2): 389-395.
- Kudryavtsev, B. N., M. V. Kudryavtseva, et al. (1993). "Human hepatocyte polyploidization kinetics in the course of life cycle." *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **64**(6): 387-393.
- Kumar, M., S. Y. Jung, et al. (2011). "Hepatitis B virus regulatory HBx protein binds to adaptor protein IPS-1 and inhibits the activation of beta interferon." *J Virol* **85**(2): 987-995.
- Kumar, V., N. Jayasuryan, et al. (1996). "A truncated mutant (residues 58-140) of the hepatitis B virus X protein retains transactivation function." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(11): 5647-5652.
- Kuo, C. Y., J. I. Tsai, et al. (2012). "Apoptosis induced by hepatitis B virus X protein in a CCL13-HBx stable cell line." *Oncol Rep* **28**(1): 127-132.
- Kuo, C. Y., J. C. Wang, et al. (2008). "Effects of hepatitis B virus X protein (HBx) on cell-growth inhibition in a CCL13-HBx stable cell line." *Intervirology* **51**(1): 26-32.
- Kweon, S. M., F. Chi, et al. (2016). "Wnt Pathway Stabilizes MeCP2 Protein to Repress PPAR-gamma in Activation of Hepatic Stellate Cells." *PLoS One* **11**(5): e0156111.
- Kwun, H. J. and K. L. Jang (2004). "Natural variants of hepatitis B virus X protein have differential effects on the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene." *Nucleic Acids Res* **32**(7): 2202-2213.
- Lai, C. L., S. H. Ahn, et al. (2014). "Phase IIb multicentred randomised trial of besifovir (LB80380) versus entecavir in Asian patients with chronic hepatitis B." *Gut* **63**(6): 996-1004.
- Lai, C. L., J. Dienstag, et al. (2003). "Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B." *Clin Infect Dis* **36**(6): 687-696.
- Lakner, A. M., N. M. Steuerwald, et al. (2012). "Inhibitory effects of microRNA 19b in hepatic stellate cell-mediated fibrogenesis." *Hepatology* **56**(1): 300-310.

- Lammens, T., V. Boudolf, et al. (2008). "Atypical E2F activity restrains APC/CCCS52A2 function obligatory for endocycle onset." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(38): 14721-14726.
- Lan, T., T. Kisseleva, et al. (2015). "Deficiency of NOX1 or NOX4 Prevents Liver Inflammation and Fibrosis in Mice through Inhibition of Hepatic Stellate Cell Activation." *PLoS One* **10**(7): e0129743.
- Lan, Y. T., J. Li, et al. (1999). "Roles of the three major phosphorylation sites of hepatitis B virus core protein in viral replication." *Virology* **259**(2): 342-348.
- Lane, H. A. and E. A. Nigg (1996). "Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes." *J Cell Biol* **135**(6 Pt 2): 1701-1713.
- Lanford, R. E., B. Guerra, et al. (2013). "GS-9620, an oral agonist of Toll-like receptor-7, induces prolonged suppression of hepatitis B virus in chronically infected chimpanzees." *Gastroenterology* **144**(7): 1508-1517, 1517 e1501-1510.
- Lankat-Buttgereit, B. and R. Goke (2009). "The tumour suppressor Pcd4: recent advances in the elucidation of function and regulation." *Biol Cell* **101**(6): 309-317.
- Lara-Pezzi, E., M. V. Gomez-Gavero, et al. (2002). "The hepatitis B virus X protein promotes tumor cell invasion by inducing membrane-type matrix metalloproteinase-1 and cyclooxygenase-2 expression." *J Clin Invest* **110**(12): 1831-1838.
- Lara-Pezzi, E., P. L. Majano, et al. (1998). "The hepatitis B virus X protein up-regulates tumor necrosis factor alpha gene expression in hepatocytes." *Hepatology* **28**(4): 1013-1021.
- Lara-Pezzi, E., P. L. Majano, et al. (2001). "Effect of the hepatitis B virus HBx protein on integrin-mediated adhesion to and migration on extracellular matrix." *J Hepatol* **34**(3): 409-415.
- Lara-Pezzi, E., S. Roche, et al. (2001). "The hepatitis B virus HBx protein induces adherens junction disruption in a src-dependent manner." *Oncogene* **20**(26): 3323-3331.
- Lara-Pezzi, E., J. M. Serrador, et al. (2001). "The hepatitis B virus X protein (HBx) induces a migratory phenotype in a CD44-dependent manner: possible role of HBx in invasion and metastasis." *Hepatology* **33**(5): 1270-1281.
- Lau, C. C., T. Sun, et al. (2014). "Viral-human chimeric transcript predisposes risk to liver cancer development and progression." *Cancer Cell* **25**(3): 335-349.
- Le Duff, Y., M. Blanchet, et al. (2009). "The pre-S1 and antigenic loop infectivity determinants of the hepatitis B virus envelope proteins are functionally independent." *J Virol* **83**(23): 12443-12451.
- Lee, D. K., S. H. Park, et al. (2001). "The hepatitis B virus encoded oncoprotein pX amplifies TGF-beta family signaling through direct interaction with Smad4: potential mechanism of hepatitis B virus-induced liver fibrosis." *Genes Dev* **15**(4): 455-466.
- Lee, J. H., J. L. Ku, et al. (1999). "Establishment and characterization of four human hepatocellular carcinoma cell lines containing hepatitis B virus DNA." *World J Gastroenterol* **5**(4): 289-295.
- Lee, J. H. and H. M. Rho (2001). "Nuclear factor of activated T cells (NFAT1-C) represses the enhancer II and pregenomic promoter (EnII/Cp) of hepatitis B virus (HBV) through its responsive site GGAGA and nullifies the HBx-driven transcriptional activation." *IUBMB Life* **51**(4): 255-261.

- Lee, J. O., H. J. Kwun, et al. (2005). "Hepatitis B virus X protein represses E-cadherin expression via activation of DNA methyltransferase 1." *Oncogene* **24**(44): 6617-6625.
- Lee, J. S., I. S. Chu, et al. (2004). "Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling." *Hepatology* **40**(3): 667-676.
- Lee, J. S., J. Heo, et al. (2006). "A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells." *Nat Med* **12**(4): 410-416.
- Lee, M. O., Y. H. Choi, et al. (2002). "Hepatitis B virus X protein induced expression of interleukin 18 (IL-18): a potential mechanism for liver injury caused by hepatitis B virus (HBV) infection." *J Hepatol* **37**(3): 380-386.
- Lee, S., M. J. Lee, et al. (2016). "C-terminal-truncated HBV X promotes hepato-oncogenesis through inhibition of tumor-suppressive beta-catenin/BAMBI signaling." *Exp Mol Med* **48**(12): e275.
- Lee, S. W., Y. M. Lee, et al. (2000). "Human hepatitis B virus X protein is a possible mediator of hypoxia-induced angiogenesis in hepatocarcinogenesis." *Biochem Biophys Res Commun* **268**(2): 456-461.
- Lee, T. K., K. Man, et al. (2006). "Signal transducers and activators of transcription 5b activation enhances hepatocellular carcinoma aggressiveness through induction of epithelial-mesenchymal transition." *Cancer Res* **66**(20): 9948-9956.
- Lee, U. E. and S. L. Friedman (2011). "Mechanisms of hepatic fibrogenesis." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **25**(2): 195-206.
- Lee, Y. I., J. M. Hwang, et al. (2004). "Human hepatitis B virus-X protein alters mitochondrial function and physiology in human liver cells." *J Biol Chem* **279**(15): 15460-15471.
- Lehman, N. L., R. Tibshirani, et al. (2007). "Oncogenic regulators and substrates of the anaphase promoting complex/cyclosome are frequently overexpressed in malignant tumors." *Am J Pathol* **170**(5): 1793-1805.
- Leupin, O., S. Bontron, et al. (2005). "Hepatitis B virus X protein stimulates viral genome replication via a DDB1-dependent pathway distinct from that leading to cell death." *J Virol* **79**(7): 4238-4245.
- Levene, C. and B. S. Blumberg (1969). "Additional specificities of Australia antigen and the possible identification of hepatitis carriers." *Nature* **221**(5176): 195-196.
- Levrero, M., T. Pollicino, et al. (2009). "Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection." *J Hepatol* **51**(3): 581-592.
- Levrero, M. and J. Zucman-Rossi (2016). "Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma." *J Hepatol* **64**(1 Suppl): S84-101.
- Li, D., J. Cen, et al. (2013). "Hepatic loss of survivin impairs postnatal liver development and promotes expansion of hepatic progenitor cells in mice." *Hepatology* **58**(6): 2109-2121.
- Li, D., L. He, et al. (2015). "Targeting activated hepatic stellate cells (aHSCs) for liver fibrosis imaging." *EJNMMI Res* **5**(1): 71.
- Li, F., X. Wang, et al. (1996). "Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development." *J Mol Cell Cardiol* **28**(8): 1737-1746.
- Li, M., H. Zhao, et al. (2011). "Inactivating mutations of the chromatin remodeling gene ARID2 in hepatocellular carcinoma." *Nat Genet* **43**(9): 828-829.

- Li, T., E. I. Robert, et al. (2010). "A promiscuous alpha-helical motif anchors viral hijackers and substrate receptors to the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase machinery." *Nat Struct Mol Biol* **17**(1): 105-111.
- Li, W., K. Goto, et al. (2015). "The characteristic changes in hepatitis B virus x region for hepatocellular carcinoma: a comprehensive analysis based on global data." *PLoS One* **10**(5): e0125555.
- Lieberman, H. M., W. W. Tung, et al. (1987). "Splenic replication of hepatitis B virus in the chimpanzee chronic carrier." *J Med Virol* **21**(4): 347-359.
- Lim, S. and P. Kaldis (2013). "Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation." *Development* **140**(15): 3079-3093.
- Lin, C. L. and J. H. Kao (2016). "Review article: novel therapies for hepatitis B virus cure - advances and perspectives." *Aliment Pharmacol Ther* **44**(3): 213-222.
- Lin, M. H. and S. C. Lo (1989). "Dimerization of hepatitis B viral X protein synthesized in a cell-free system." *Biochem Biophys Res Commun* **164**(1): 14-21.
- Lingle, W. L., S. L. Barrett, et al. (2002). "Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(4): 1978-1983.
- Liou, Y. C., X. Z. Zhou, et al. (2011). "Prolyl isomerase Pin1 as a molecular switch to determine the fate of phosphoproteins." *Trends Biochem Sci* **36**(10): 501-514.
- Liu, F. Y., S. J. Zhou, et al. (2015). "MiR-216b is involved in pathogenesis and progression of hepatocellular carcinoma through HBx-miR-216b-IGF2BP2 signaling pathway." *Cell Death Dis* **6**: e1670.
- Liu, H., Y. Yuan, et al. (2012). "Hepatitis B virus encoded X protein suppresses apoptosis by inhibition of the caspase-independent pathway." *J Proteome Res* **11**(10): 4803-4813.
- Liu, L. P., H. F. Liang, et al. (2010). "The role of NF-kappaB in Hepatitis b virus X protein-mediated upregulation of VEGF and MMPs." *Cancer Invest* **28**(5): 443-451.
- Liu, N., J. Zhang, et al. (2013). "Hepatitis B virus inhibits apoptosis of hepatoma cells by sponging the MicroRNA 15a/16 cluster." *J Virol* **87**(24): 13370-13378.
- Liu, S., H. Zhang, et al. (2009). "Associations between hepatitis B virus mutations and the risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis." *J Natl Cancer Inst* **101**(15): 1066-1082.
- Liu, X., L. Wang, et al. (2008). "Mutations in the C-terminus of the X protein of hepatitis B virus regulate Wnt-5a expression in hepatoma Huh7 cells: cDNA microarray and proteomic analyses." *Carcinogenesis* **29**(6): 1207-1214.
- Liu, Y., J. Li, et al. (2015). "Hepatitis B virus polymerase disrupts K63-linked ubiquitination of STING to block innate cytosolic DNA-sensing pathways." *J Virol* **89**(4): 2287-2300.
- Livingston, S. E., J. P. Simonetti, et al. (2007). "Hepatitis B virus genotypes in Alaska Native people with hepatocellular carcinoma: preponderance of genotype F." *J Infect Dis* **195**(1): 5-11.
- Lok, A. S. and B. J. McMahon (2009). "Chronic hepatitis B: update 2009." *Hepatology* **50**(3): 661-662.
- Lopez-Cabrera, M., J. Letovsky, et al. (1990). "Multiple liver-specific factors bind to the hepatitis B virus core/pregenomic promoter: trans-activation and repression by CCAAT/enhancer binding protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(13): 5069-5073.

- Lu, B., H. Guo, et al. (2010). "Increased expression of iASPP, regulated by hepatitis B virus X protein-mediated NF-kappaB activation, in hepatocellular carcinoma." *Gastroenterology* **139**(6): 2183-2194 e2185.
- Lu, H. L. and F. Liao (2013). "Melanoma differentiation-associated gene 5 senses hepatitis B virus and activates innate immune signaling to suppress virus replication." *J Immunol* **191**(6): 3264-3276.
- Lu, P., S. Prost, et al. (2007). "Microarray analysis of gene expression of mouse hepatocytes of different ploidy." *Mamm Genome* **18**(9): 617-626.
- Lucifora, J., S. Arzberger, et al. (2011). "Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection." *J Hepatol* **55**(5): 996-1003.
- Lucifora, J., D. Durantel, et al. (2010). "Control of hepatitis B virus replication by innate response of HepaRG cells." *Hepatology* **51**(1): 63-72.
- Lucifora, J., Y. Xia, et al. (2014). "Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA." *Science* **343**(6176): 1221-1228.
- Lundmark, M. (2006). "Polyploidization, hybridization and geographical parthenogenesis." *Trends Ecol Evol* **21**(1): 9; author reply 10.
- Luo, L., S. Chen, et al. (2013). "Hepatitis B virus X protein modulates remodelling of minichromosomes related to hepatitis B virus replication in HepG2 cells." *Int J Mol Med* **31**(1): 197-204.
- Lupberger, J., S. Schaedler, et al. (2013). "Identification and characterization of a novel bipartite nuclear localization signal in the hepatitis B virus polymerase." *World J Gastroenterol* **19**(44): 8000-8010.
- Ma, N. F., S. H. Lau, et al. (2008). "COOH-terminal truncated HBV X protein plays key role in hepatocarcinogenesis." *Clin Cancer Res* **14**(16): 5061-5068.
- Mabit, H., K. M. Breiner, et al. (2001). "Signals for bidirectional nucleocytoplasmic transport in the duck hepatitis B virus capsid protein." *J Virol* **75**(4): 1968-1977.
- MacAuley, A., J. C. Cross, et al. (1998). "Reprogramming the cell cycle for endoreduplication in rodent trophoblast cells." *Mol Biol Cell* **9**(4): 795-807.
- Machida, K., J. C. Liu, et al. (2009). "Hepatitis C virus causes uncoupling of mitotic checkpoint and chromosomal polyploidy through the Rb pathway." *J Virol* **83**(23): 12590-12600.
- Macovei, A., C. Petreanu, et al. (2013). "Regulation of hepatitis B virus infection by Rab5, Rab7, and the endolysosomal compartment." *J Virol* **87**(11): 6415-6427.
- Macovei, A., C. Radulescu, et al. (2010). "Hepatitis B virus requires intact caveolin-1 function for productive infection in HepaRG cells." *J Virol* **84**(1): 243-253.
- Maepa, M. B., I. Roelofse, et al. (2015). "Progress and Prospects of Anti-HBV Gene Therapy Development." *Int J Mol Sci* **16**(8): 17589-17610.
- Maini, M. K., C. Boni, et al. (2000). "The role of virus-specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection." *J Exp Med* **191**(8): 1269-1280.
- Malumbres, M. and M. Barbacid (2001). "To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer." *Nat Rev Cancer* **1**(3): 222-231.
- Malumbres, M., R. Sotillo, et al. (2004). "Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6." *Cell* **118**(4): 493-504.

- Mancini, M., M. Hadchouel, et al. (1996). "DNA-mediated immunization in a transgenic mouse model of the hepatitis B surface antigen chronic carrier state." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(22): 12496-12501.
- Mao, Y., L. Da, et al. (2011). "Hepatitis B virus X protein reduces starvation-induced cell death through activation of autophagy and inhibition of mitochondrial apoptotic pathway." Biochem Biophys Res Commun **415**(1): 68-74.
- Marcellin, P., M. Buti, et al. (2014). "Kinetics of hepatitis B surface antigen loss in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B treated with tenofovir disoproxil fumarate." J Hepatol **61**(6): 1228-1237.
- Marcellin, P., E. J. Heathcote, et al. (2008). "Tenofovir disoproxil fumarate versus adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B." N Engl J Med **359**(23): 2442-2455.
- March, S., E. E. Hui, et al. (2009). "Microenvironmental regulation of the sinusoidal endothelial cell phenotype in vitro." Hepatology **50**(3): 920-928.
- Margall-Ducos, G., S. Celton-Morizur, et al. (2007). "Liver tetraploidization is controlled by a new process of incomplete cytokinesis." J Cell Sci **120**(Pt 20): 3633-3639.
- Martin-Vilchez, S., P. Sanz-Cameno, et al. (2008). "The hepatitis B virus X protein induces paracrine activation of human hepatic stellate cells." Hepatology **47**(6): 1872-1883.
- Martin, P., C. Dubois, et al. (2015). "TG1050, an immunotherapeutic to treat chronic hepatitis B, induces robust T cells and exerts an antiviral effect in HBV-persistent mice." Gut **64**(12): 1961-1971.
- Marumoto, T., D. Zhang, et al. (2005). "Aurora-A - a guardian of poles." Nat Rev Cancer **5**(1): 42-50.
- Mason, W. S., U. S. Gill, et al. (2016). "HBV DNA Integration and Clonal Hepatocyte Expansion in Chronic Hepatitis B Patients Considered Immune Tolerant." Gastroenterology **151**(5): 986-998 e984.
- Mason, W. S., A. R. Jilbert, et al. (2005). "Clonal expansion of hepatocytes during chronic woodchuck hepatitis virus infection." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(4): 1139-1144.
- Mason, W. S., C. Liu, et al. (2010). "Clonal expansion of normal-appearing human hepatocytes during chronic hepatitis B virus infection." J Virol **84**(16): 8308-8315.
- Mason, W. S., G. Seal, et al. (1980). "Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus." J Virol **36**(3): 829-836.
- Mathonnet, G., S. Lachance, et al. (2004). "Expression of hepatitis B virus X oncoprotein inhibits transcription-coupled nucleotide excision repair in human cells." Mutat Res **554**(1-2): 305-318.
- Matsuda, Y. and T. Ichida (2009). "Impact of hepatitis B virus X protein on the DNA damage response during hepatocarcinogenesis." Med Mol Morphol **42**(3): 138-142.
- Matsumura, F. (2005). "Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes." Trends Cell Biol **15**(7): 371-377.
- Matsuoka, M. and H. Tsukamoto (1990). "Stimulation of hepatic lipocyte collagen production by Kupffer cell-derived transforming growth factor beta: implication for a pathogenetic role in alcoholic liver fibrogenesis." Hepatology **11**(4): 599-605.
- Matsuoka, M., M. Y. Zhang, et al. (1990). "Sensitization of hepatic lipocytes by high-fat diet to stimulatory effects of Kupffer cell-derived factors: implication in alcoholic liver fibrogenesis." Hepatology **11**(2): 173-182.

- McClain, S. L., A. J. Clippinger, et al. (2007). "Hepatitis B virus replication is associated with an HBx-dependent mitochondrion-regulated increase in cytosolic calcium levels." *J Virol* **81**(21): 12061-12065.
- Melegari, M., S. K. Wolf, et al. (2005). "Hepatitis B virus DNA replication is coordinated by core protein serine phosphorylation and HBx expression." *J Virol* **79**(15): 9810-9820.
- Meng, F., K. Wang, et al. (2012). "Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice." *Gastroenterology* **143**(3): 765-776 e763.
- Menne, S., D. B. Tumas, et al. (2015). "Sustained efficacy and seroconversion with the Toll-like receptor 7 agonist GS-9620 in the Woodchuck model of chronic hepatitis B." *J Hepatol* **62**(6): 1237-1245.
- Meraldi, P., J. Lukas, et al. (1999). "Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2-cyclin A." *Nat Cell Biol* **1**(2): 88-93.
- Meyer, M., W. H. Caselmann, et al. (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.
- Mishima, M., S. Kaitna, et al. (2002). "Central spindle assembly and cytokinesis require a kinesin-like protein/RhoGAP complex with microtubule bundling activity." *Dev Cell* **2**(1): 41-54.
- Moolla, N., M. Kew, et al. (2002). "Regulatory elements of hepatitis B virus transcription." *J Viral Hepat* **9**(5): 323-331.
- Moon, E. J., C. H. Jeong, et al. (2004). "Hepatitis B virus X protein induces angiogenesis by stabilizing hypoxia-inducible factor-1alpha." *FASEB J* **18**(2): 382-384.
- Moore, G. (1995). "Cereal genome evolution: pastoral pursuits with 'Lego' genomes." *Curr Opin Genet Dev* **5**(6): 717-724.
- Moriyama, T., S. Guilhot, et al. (1990). "Immunobiology and pathogenesis of hepatocellular injury in hepatitis B virus transgenic mice." *Science* **248**(4953): 361-364.
- Mota, A., J. Areias, et al. (2011). "Chronic liver disease and cirrhosis among patients with hepatitis B virus infection in northern Portugal with reference to the viral genotypes." *J Med Virol* **83**(1): 71-77.
- Mukherji, A., V. C. Janbandhu, et al. (2007). "HBx-dependent cell cycle deregulation involves interaction with cyclin E/A-cdk2 complex and destabilization of p27Kip1." *Biochem J* **401**(1): 247-256.
- Muller, C., K. F. Bergmann, et al. (1992). "Production of hepatitis B virus by stably transfected monocytic cell line U-937: a model for extrahepatic hepatitis B virus replication." *J Infect Dis* **165**(5): 929-933.
- Munns, R. and M. Tester (2008). "Mechanisms of salinity tolerance." *Annu Rev Plant Biol* **59**: 651-681.
- Murakami, S., J. H. Cheong, et al. (1994). "Human hepatitis virus X gene encodes a regulatory domain that represses transactivation of X protein." *J Biol Chem* **269**(21): 15118-15123.
- Murphy, C. M., Y. Xu, et al. (2016). "Hepatitis B Virus X Protein Promotes Degradation of SMC5/6 to Enhance HBV Replication." *Cell Rep* **16**(11): 2846-2854.

- Musacchio, A. and K. G. Hardwick (2002). "The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(10): 731-741.
- Musacchio, A. and E. D. Salmon (2007). "The spindle-assembly checkpoint in space and time." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(5): 379-393.
- Naito, M., G. Hasegawa, et al. (2004). "Differentiation and function of Kupffer cells." Med Electron Microsc **37**(1): 16-28.
- Nakajima, T., M. Moriguchi, et al. (2004). "Centrosome aberration accompanied with p53 mutation can induce genetic instability in hepatocellular carcinoma." Mod Pathol **17**(6): 722-727.
- Nakamura, M., X. Z. Zhou, et al. (2001). "Critical role for the EB1 and APC interaction in the regulation of microtubule polymerization." Curr Biol **11**(13): 1062-1067.
- Nakanishi, K., M. Sakamoto, et al. (2005). "Akt phosphorylation is a risk factor for early disease recurrence and poor prognosis in hepatocellular carcinoma." Cancer **103**(2): 307-312.
- Nannini, P. and E. M. Sokal (2017). "Hepatitis B: changing epidemiology and interventions." Arch Dis Child **102**(7): 0.
- 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.
- Nathke, I. (2004). "APC at a glance." J Cell Sci **117**(Pt 21): 4873-4875.
- Nault, J. C., J. Calderaro, et al. (2014). "Telomerase reverse transcriptase promoter mutation is an early somatic genetic alteration in the transformation of premalignant nodules in hepatocellular carcinoma on cirrhosis." Hepatology **60**(6): 1983-1992.
- Nault, J. C., M. Mallet, et al. (2013). "High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions." Nat Commun **4**: 2218.
- Nevzorova, Y. A., D. Tschaharganeh, et al. (2009). "Aberrant cell cycle progression and endoreplication in regenerating livers of mice that lack a single E-type cyclin." Gastroenterology **137**(2): 691-703, 703 e691-696.
- Ng, K. Y., S. Chai, et al. (2016). "C-terminal truncated hepatitis B virus X protein promotes hepatocellular carcinogenesis through induction of cancer and stem cell-like properties." Oncotarget **7**(17): 24005-24017.
- Nguyen, H. G. and K. Ravid (2010). "Polyploidy: mechanisms and cancer promotion in hematopoietic and other cells." Adv Exp Med Biol **676**: 105-122.
- Ni, Y., F. A. Lempp, et al. (2014). "Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes." Gastroenterology **146**(4): 1070-1083.
- Nigg, E. A. (2002). "Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression?" Nat Rev Cancer **2**(11): 815-825.
- Nigg, E. A. (2006). "Origins and consequences of centrosome aberrations in human cancers." Int J Cancer **119**(12): 2717-2723.
- Nigg, E. A. and T. Stearns (2011). "The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries." Nat Cell Biol **13**(10): 1154-1160.

- Nilsson, I. and I. Hoffmann (2000). "Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family." Prog Cell Cycle Res **4**: 107-114.
- Niu, C., C. M. Livingston, et al. (2017). "The Smc5/6 Complex Restricts HBV when Localized to ND10 without Inducing an Innate Immune Response and Is Counteracted by the HBV X Protein Shortly after Infection." PLoS One **12**(1): e0169648.
- Noh, E. J., H. J. Jung, et al. (2004). "Subcellular localization and transcriptional repressor activity of HBx on p21(WAF1/Cip1) promoter is regulated by ERK-mediated phosphorylation." Biochem Biophys Res Commun **319**(3): 738-745.
- Noordeen, F., C. A. Scougall, et al. (2015). "Therapeutic Antiviral Effect of the Nucleic Acid Polymerase REP 2055 against Persistent Duck Hepatitis B Virus Infection." PLoS One **10**(11): e0140909.
- Norton, P. A., H. M. Reis, et al. (2004). "Activation of fibronectin gene expression by hepatitis B virus x antigen." J Viral Hepat **11**(4): 332-341.
- Novo, E., C. Busletta, et al. (2011). "Intracellular reactive oxygen species are required for directional migration of resident and bone marrow-derived hepatic pro-fibrogenic cells." J Hepatol **54**(5): 964-974.
- Novo, E. and M. Parola (2008). "Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis." Fibrogenesis Tissue Repair **1**(1): 5.
- Nowak, M. A., S. Bonhoeffer, et al. (1996). "Viral dynamics in hepatitis B virus infection." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(9): 4398-4402.
- Ogawa, T., M. Enomoto, et al. (2012). "MicroRNA-221/222 upregulation indicates the activation of stellate cells and the progression of liver fibrosis." Gut **61**(11): 1600-1609.
- Ogle, B. M., M. Cascalho, et al. (2005). "Biological implications of cell fusion." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(7): 567-575.
- Ohno, H., S. Kaneko, et al. (1997). "Human hepatitis B virus enhancer 1 is responsive to human interleukin-6." J Med Virol **52**(4): 413-418.
- Oishi, N., K. Shilagardi, et al. (2007). "Hepatitis B virus X protein overcomes oncogenic RAS-induced senescence in human immortalized cells." Cancer Sci **98**(10): 1540-1548.
- Ono, S. K., N. Kato, et al. (2001). "The polymerase L528M mutation cooperates with nucleotide binding-site mutations, increasing hepatitis B virus replication and drug resistance." J Clin Invest **107**(4): 449-455.
- Orr-Weaver, T. L. (2015). "When bigger is better: the role of polyploidy in organogenesis." Trends Genet **31**(6): 307-315.
- Ortega, S., I. Prieto, et al. (2003). "Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice." Nat Genet **35**(1): 25-31.
- Ott, J. J., G. A. Stevens, et al. (2012). "Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity." Vaccine **30**(12): 2212-2219.
- Otto, S. P. (2007). "The evolutionary consequences of polyploidy." Cell **131**(3): 452-462.
- Otto, S. P. and J. Whitton (2000). "Polyploid incidence and evolution." Annu Rev Genet **34**: 401-437.
- Pagano, M., R. Pepperkok, et al. (1992). "Cyclin A is required at two points in the human cell cycle." EMBO J **11**(3): 961-971.

- Pan, J., L. X. Duan, et al. (2001). "Hepatitis B virus X protein protects against anti-Fas-mediated apoptosis in human liver cells by inducing NF-kappa B." *J Gen Virol* **82**(Pt 1): 171-182.
- Pan, J., Z. Lian, et al. (2007). "The hepatitis B x antigen effector, URG7, blocks tumour necrosis factor alpha-mediated apoptosis by activation of phosphoinositol 3-kinase and beta-catenin." *J Gen Virol* **88**(Pt 12): 3275-3285.
- Pan, X., H. Cao, et al. (2011). "Interleukin-32 expression induced by hepatitis B virus protein X is mediated through activation of NF-kappaB." *Mol Immunol* **48**(12-13): 1573-1577.
- Pancholi, P., D. H. Lee, et al. (2001). "DNA prime/canarypox boost-based immunotherapy of chronic hepatitis B virus infection in a chimpanzee." *Hepatology* **33**(2): 448-454.
- Pandey, V. and V. Kumar (2012). "HBx protein of hepatitis B virus promotes reinitiation of DNA replication by regulating expression and intracellular stability of replication licensing factor CDC6." *J Biol Chem* **287**(24): 20545-20554.
- Pandit, S. K., B. Westendorp, et al. (2013). "Physiological significance of polyploidization in mammalian cells." *Trends Cell Biol* **23**(11): 556-566.
- Pandit, S. K., B. Westendorp, et al. (2012). "E2F8 is essential for polyploidization in mammalian cells." *Nat Cell Biol* **14**(11): 1181-1191.
- Pang, R., T. K. Lee, et al. (2007). "Pin1 interacts with a specific serine-proline motif of hepatitis B virus X-protein to enhance hepatocarcinogenesis." *Gastroenterology* **132**(3): 1088-1103.
- Pante, N. and M. Kann (2002). "Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm." *Mol Biol Cell* **13**(2): 425-434.
- Pardo, M., J. Bartolome, et al. (2007). "Current therapy of chronic hepatitis B." *Arch Med Res* **38**(6): 661-677.
- Parekh, V. V., S. Lalani, et al. (2007). "The in vivo response of invariant natural killer T cells to glycolipid antigens." *Int Rev Immunol* **26**(1-2): 31-48.
- Park, I. Y., B. H. Sohn, et al. (2007). "Aberrant epigenetic modifications in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis B virus X protein." *Gastroenterology* **132**(4): 1476-1494.
- Parola, M., M. Pinzani, et al. (1993). "Stimulation of lipid peroxidation or 4-hydroxynonenal treatment increases procollagen alpha 1 (I) gene expression in human liver fat-storing cells." *Biochem Biophys Res Commun* **194**(3): 1044-1050.
- Pasquinelli, C., K. Bhavani, et al. (1992). "Multiple oncogenes and tumor suppressor genes are structurally and functionally intact during hepatocarcinogenesis in hepatitis B virus transgenic mice." *Cancer Res* **52**(10): 2823-2829.
- Pasquinelli, C., F. Laure, et al. (1986). "Hepatitis B virus DNA in mononuclear blood cells. A frequent event in hepatitis B surface antigen-positive and -negative patients with acute and chronic liver disease." *J Hepatol* **3**(1): 95-103.
- Paterlini-Brechot, P., K. Saigo, et al. (2003). "Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene." *Oncogene* **22**(25): 3911-3916.
- Paterson, A. H. (2005). "Polyploidy, evolutionary opportunity, and crop adaptation." *Genetica* **123**(1-2): 191-196.
- Patient, R., C. Hourieux, et al. (2009). "Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles." *Cell Microbiol* **11**(11): 1561-1570.

- Pavicic-Kaltenbrunner, V., M. Mishima, et al. (2007). "Cooperative assembly of CYK-4/MgcRacGAP and ZEN-4/MKLP1 to form the centralspindlin complex." *Mol Biol Cell* **18**(12): 4992-5003.
- Pei, R., B. Qin, et al. (2014). "Interferon-induced proteins with tetratricopeptide repeats 1 and 2 are cellular factors that limit hepatitis B virus replication." *J Innate Immun* **6**(2): 182-191.
- Peng, G., S. Li, et al. (2008). "PD-1 upregulation is associated with HBV-specific T cell dysfunction in chronic hepatitis B patients." *Mol Immunol* **45**(4): 963-970.
- Penna, A., G. Del Prete, et al. (1997). "Predominant T-helper 1 cytokine profile of hepatitis B virus nucleocapsid-specific T cells in acute self-limited hepatitis B." *Hepatology* **25**(4): 1022-1027.
- Peppas, D., U. S. Gill, et al. (2013). "Up-regulation of a death receptor renders antiviral T cells susceptible to NK cell-mediated deletion." *J Exp Med* **210**(1): 99-114.
- Perlman, D. H., E. A. Berg, et al. (2005). "Reverse transcription-associated dephosphorylation of hepadnavirus nucleocapsids." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(25): 9020-9025.
- Persing, D. H., H. E. Varmus, et al. (1987). "The preS1 protein of hepatitis B virus is acylated at its amino terminus with myristic acid." *J Virol* **61**(5): 1672-1677.
- Peters, J. M. (2006). "The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(9): 644-656.
- Petersen, J. and M. Dandri (2015). "Optimal therapy for chronic hepatitis B: hepatitis B virus combination therapy?" *Liver Int* **35 Suppl 1**: 114-120.
- Petersen, J., M. Dandri, et al. (2008). "Prevention of hepatitis B virus infection in vivo by entry inhibitors derived from the large envelope protein." *Nat Biotechnol* **26**(3): 335-341.
- Petronczki, M., M. Glotzer, et al. (2007). "Polo-like kinase 1 triggers the initiation of cytokinesis in human cells by promoting recruitment of the RhoGEF Ect2 to the central spindle." *Dev Cell* **12**(5): 713-725.
- Piekny, A. J. and M. Glotzer (2008). "Anillin is a scaffold protein that links RhoA, actin, and myosin during cytokinesis." *Curr Biol* **18**(1): 30-36.
- Pihan, G. A. (2013). "Centrosome dysfunction contributes to chromosome instability, chromoanagenesis, and genome reprogramming in cancer." *Front Oncol* **3**: 277.
- Piskur, J., E. Rozpedowska, et al. (2006). "How did Saccharomyces evolve to become a good brewer?" *Trends Genet* **22**(4): 183-186.
- Polakis, P. (1997). "The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor." *Biochim Biophys Acta* **1332**(3): F127-147.
- Pollicino, T., L. Bellinghieri, et al. (2013). "Hepatitis B virus (HBV) induces the expression of interleukin-8 that in turn reduces HBV sensitivity to interferon-alpha." *Virology* **444**(1-2): 317-328.
- Pollicino, T., L. Belloni, et al. (2006). "Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones." *Gastroenterology* **130**(3): 823-837.
- Pollicino, T., O. Terradillos, et al. (1998). "Pro-apoptotic effect of the hepatitis B virus X gene." *Biomed Pharmacother* **52**(9): 363-368.

- Pommier, Y. and K. W. Kohn (2003). "[Cell cycle and checkpoints in oncology: new therapeutic targets]." *Med Sci (Paris)* **19**(2): 173-186.
- Pontisso, P., M. C. Poon, et al. (1984). "Detection of hepatitis B virus DNA in mononuclear blood cells." *Br Med J (Clin Res Ed)* **288**(6430): 1563-1566.
- Poussin, K., H. Dienes, et al. (1999). "Expression of mutated hepatitis B virus X genes in human hepatocellular carcinomas." *Int J Cancer* **80**(4): 497-505.
- Poynard, T., P. Lebray, et al. (2010). "Prevalence of liver fibrosis and risk factors in a general population using non-invasive biomarkers (FibroTest)." *BMC Gastroenterol* **10**: 40.
- Poynard, T., J. Massard, et al. (2009). "Impact of interferon-alpha treatment on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B: an overview of published trials." *Gastroenterol Clin Biol* **33**(10-11): 916-922.
- Publicover, J., A. Gaggar, et al. (2013). "Age-dependent hepatic lymphoid organization directs successful immunity to hepatitis B." *J Clin Invest* **123**(9): 3728-3739.
- Puche, J. E., Y. Saiman, et al. (2013). "Hepatic stellate cells and liver fibrosis." *Compr Physiol* **3**(4): 1473-1492.
- Qadri, I., H. F. Maguire, et al. (1995). "Hepatitis B virus transactivator protein X interacts with the TATA-binding protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(4): 1003-1007.
- Qi, Y., Z. Gao, et al. (2016). "DNA Polymerase kappa Is a Key Cellular Factor for the Formation of Covalently Closed Circular DNA of Hepatitis B Virus." *PLoS Pathog* **12**(10): e1005893.
- Qiao, L., K. Leach, et al. (2001). "Hepatitis B virus X protein increases expression of p21(Cip-1/WAF1/MDA6) and p27(Kip-1) in primary mouse hepatocytes, leading to reduced cell cycle progression." *Hepatology* **34**(5): 906-917.
- Qiu, X., S. Dong, et al. (2013). "HBx-mediated miR-21 upregulation represses tumor-suppressor function of PDCD4 in hepatocellular carcinoma." *Oncogene* **32**(27): 3296-3305.
- Quetier, I., N. Brezillon, et al. (2013). "Hepatitis B virus HBx protein impairs liver regeneration through enhanced expression of IL-6 in transgenic mice." *J Hepatol* **59**(2): 285-291.
- Quetier, I., N. Brezillon, et al. (2015). "C-terminal-truncated hepatitis B virus X protein enhances the development of diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinogenesis." *J Gen Virol* **96**(Pt 3): 614-625.
- Quintyne, N. J., J. E. Reing, et al. (2005). "Spindle multipolarity is prevented by centrosomal clustering." *Science* **307**(5706): 127-129.
- Rabe, B., D. Glebe, et al. (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.
- Rakotomalala, L., L. Studach, et al. (2008). "Hepatitis B virus X protein increases the Cdt1-to-geminin ratio inducing DNA re-replication and polyploidy." *J Biol Chem* **283**(42): 28729-28740.
- Ramachandran, P., A. Pellicoro, et al. (2012). "Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(46): E3186-3195.
- Raslova, H., A. Kauffmann, et al. (2007). "Interrelation between polyploidization and megakaryocyte differentiation: a gene profiling approach." *Blood* **109**(8): 3225-3234.

- Ravid, K., J. Lu, et al. (2002). "Roads to polyploidy: the megakaryocyte example." J Cell Physiol **190**(1): 7-20.
- Rawlings, J. S., K. M. Rosler, et al. (2004). "The JAK/STAT signaling pathway." J Cell Sci **117**(Pt 8): 1281-1283.
- Raychaudhuri, P. and H. J. Park (2011). "FoxM1: a master regulator of tumor metastasis." Cancer Res **71**(13): 4329-4333.
- Raziorrouh, B., W. Schraut, et al. (2010). "The immunoregulatory role of CD244 in chronic hepatitis B infection and its inhibitory potential on virus-specific CD8+ T-cell function." Hepatology **52**(6): 1934-1947.
- Regev, A., M. Berho, et al. (2002). "Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection." Am J Gastroenterol **97**(10): 2614-2618.
- Reifenberg, K., H. Wilts, et al. (1999). "The hepatitis B virus X protein transactivates viral core gene expression in vivo." J Virol **73**(12): 10399-10405.
- Resnitzky, D., L. Hengst, et al. (1995). "Cyclin A-associated kinase activity is rate limiting for entrance into S phase and is negatively regulated in G1 by p27Kip1." Mol Cell Biol **15**(8): 4347-4352.
- Ried, T., K. Heselmeyer-Haddad, et al. (1999). "Genomic changes defining the genesis, progression, and malignancy potential in solid human tumors: a phenotype/genotype correlation." Genes Chromosomes Cancer **25**(3): 195-204.
- Rieder, C. L. and H. Maiato (2004). "Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint." Dev Cell **7**(5): 637-651.
- Rippe, R. A. and D. A. Brenner (2004). "From quiescence to activation: Gene regulation in hepatic stellate cells." Gastroenterology **127**(4): 1260-1262.
- Riviere, L., L. Gerossier, et al. (2015). "HBx relieves chromatin-mediated transcriptional repression of hepatitis B viral cccDNA involving SETDB1 histone methyltransferase." J Hepatol **63**(5): 1093-1102.
- Robek, M. D., S. F. Wieland, et al. (2002). "Inhibition of hepatitis B virus replication by interferon requires proteasome activity." J Virol **76**(7): 3570-3574.
- Roberts, L. R. and G. J. Gores (2005). "Hepatocellular carcinoma: molecular pathways and new therapeutic targets." Semin Liver Dis **25**(2): 212-225.
- Rochlin, K., S. Yu, et al. (2010). "Myoblast fusion: when it takes more to make one." Dev Biol **341**(1): 66-83.
- Roden, R., A. Monie, et al. (2006). "The impact of preventive HPV vaccination." Discov Med **6**(35): 175-181.
- Roderburg, C., G. W. Urban, et al. (2011). "Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis." Hepatology **53**(1): 209-218.
- Rollier, C., C. Sunyach, et al. (1999). "Protective and therapeutic effect of DNA-based immunization against hepadnavirus large envelope protein." Gastroenterology **116**(3): 658-665.
- Rosmorduc, O., M. A. Petit, et al. (1995). "In vivo and in vitro expression of defective hepatitis B virus particles generated by spliced hepatitis B virus RNA." Hepatology **22**(1): 10-19.

- Rost, M., S. Mann, et al. (2006). "Gamma-adaptin, a novel ubiquitin-interacting adaptor, and Nedd4 ubiquitin ligase control hepatitis B virus maturation." *J Biol Chem* **281**(39): 29297-29308.
- Royzman, I. and T. L. Orr-Weaver (1998). "S phase and differential DNA replication during *Drosophila* oogenesis." *Genes Cells* **3**(12): 767-776.
- Ruchaud, S., M. Carmena, et al. (2007). "The chromosomal passenger complex: one for all and all for one." *Cell* **131**(2): 230-231.
- Rudalska, R., D. Dauch, et al. (2014). "In vivo RNAi screening identifies a mechanism of sorafenib resistance in liver cancer." *Nat Med* **20**(10): 1138-1146.
- Sachs, B. D., G. S. Baillie, et al. (2007). "p75 neurotrophin receptor regulates tissue fibrosis through inhibition of plasminogen activation via a PDE4/cAMP/PKA pathway." *J Cell Biol* **177**(6): 1119-1132.
- Sahai, A., P. Malladi, et al. (2004). "Obese and diabetic db/db mice develop marked liver fibrosis in a model of nonalcoholic steatohepatitis: role of short-form leptin receptors and osteopontin." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**(5): G1035-1043.
- Sahin, F., R. Kannangai, et al. (2004). "mTOR and P70 S6 kinase expression in primary liver neoplasms." *Clin Cancer Res* **10**(24): 8421-8425.
- Sakurai, T., G. He, et al. (2008). "Hepatocyte necrosis induced by oxidative stress and IL-1 alpha release mediate carcinogen-induced compensatory proliferation and liver tumorigenesis." *Cancer Cell* **14**(2): 156-165.
- Sakurai, T., S. Maeda, et al. (2006). "Loss of hepatic NF-kappa B activity enhances chemical hepatocarcinogenesis through sustained c-Jun N-terminal kinase 1 activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(28): 10544-10551.
- Salisse, J. and C. Sureau (2009). "A function essential to viral entry underlies the hepatitis B virus "a" determinant." *J Virol* **83**(18): 9321-9328.
- Salmon, E. D., D. Cimini, et al. (2005). "Merotelic kinetochores in mammalian tissue cells." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**(1455): 553-568.
- Sanchez-Tapias, J. M., J. Costa, et al. (2002). "Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients." *Gastroenterology* **123**(6): 1848-1856.
- Sanchez-Valle, V., N. C. Chavez-Tapia, et al. (2012). "Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review." *Curr Med Chem* **19**(28): 4850-4860.
- Santamaria, D., C. Barriere, et al. (2007). "Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle." *Nature* **448**(7155): 811-815.
- Sanz-Cameno, P., S. Martin-Vilchez, et al. (2006). "Hepatitis B virus promotes angiopoietin-2 expression in liver tissue: role of HBV x protein." *Am J Pathol* **169**(4): 1215-1222.
- Sato, S., K. Li, et al. (2015). "The RNA sensor RIG-I dually functions as an innate sensor and direct antiviral factor for hepatitis B virus." *Immunity* **42**(1): 123-132.
- Satoh, S., Y. Daigo, et al. (2000). "AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1." *Nat Genet* **24**(3): 245-250.
- Satyanarayana, A., M. P. Manns, et al. (2004). "Telomeres and telomerase: a dual role in hepatocarcinogenesis." *Hepatology* **40**(2): 276-283.

- Sawey, E. T., M. Chanrion, et al. (2011). "Identification of a therapeutic strategy targeting amplified FGF19 in liver cancer by Oncogenomic screening." Cancer Cell **19**(3): 347-358.
- Saxena, N. K. and F. A. Anania (2015). "Adipocytokines and hepatic fibrosis." Trends Endocrinol Metab **26**(3): 153-161.
- Schliess, F., B. Gorg, et al. (2002). "Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes." FASEB J **16**(7): 739-741.
- Schluter, V., M. Meyer, et al. (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.
- Schmid, M., B. J. Evans, et al. (2015). "Polyploidy in Amphibia." Cytogenet Genome Res **145**(3-4): 315-330.
- Schmitz, K. J., J. Wohlschlaeger, et al. (2008). "Activation of the ERK and AKT signalling pathway predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma and ERK activation in cancer tissue is associated with hepatitis C virus infection." J Hepatol **48**(1): 83-90.
- Schmucker, D. L. (1990). "Hepatocyte fine structure during maturation and senescence." J Electron Microsc Tech **14**(2): 106-125.
- Schulz, C., E. Gomez Perdiguero, et al. (2012). "A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells." Science **336**(6077): 86-90.
- Schulze, A., P. Gripon, et al. (2007). "Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans." Hepatology **46**(6): 1759-1768.
- Schulze, K., S. Imbeaud, et al. (2015). "Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets." Nat Genet **47**(5): 505-511.
- Schuppan, D. and N. H. Afdhal (2008). "Liver cirrhosis." Lancet **371**(9615): 838-851.
- Schurich, A., P. Khanna, et al. (2011). "Role of the coinhibitory receptor cytotoxic T lymphocyte antigen-4 on apoptosis-Prone CD8 T cells in persistent hepatitis B virus infection." Hepatology **53**(5): 1494-1503.
- Schurich, A., L. J. Pallett, et al. (2013). "The third signal cytokine IL-12 rescues the anti-viral function of exhausted HBV-specific CD8 T cells." PLoS Pathog **9**(3): e1003208.
- Schwarzbauer, J. E. and J. L. Sechler (1999). "Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly." Curr Opin Cell Biol **11**(5): 622-627.
- Schwarze, P. E., E. O. Pettersen, et al. (1984). "Emergence of a population of small, diploid hepatocytes during hepatocarcinogenesis." Carcinogenesis **5**(10): 1267-1275.
- Schwarze, P. E., G. Saeter, et al. (1991). "Diploid growth pattern of hepatocellular tumours induced by various carcinogenic treatments." Carcinogenesis **12**(2): 325-327.
- Scott, L. J. and H. L. Y. Chan (2017). "Tenofovir Alafenamide: A Review in Chronic Hepatitis B." Drugs **77**(9): 1017-1028.
- Scott, R. M., R. Snitbhan, et al. (1980). "Experimental transmission of hepatitis B virus by semen and saliva." J Infect Dis **142**(1): 67-71.
- Seeger, C. and W. S. Mason (2000). "Hepatitis B virus biology." Microbiol Mol Biol Rev **64**(1): 51-68.

- Seglen, P. O. (1997). "DNA ploidy and autophagic protein degradation as determinants of hepatocellular growth and survival." *Cell Biol Toxicol* **13**(4-5): 301-315.
- Seki, E., S. De Minicis, et al. (2009). "CCR1 and CCR5 promote hepatic fibrosis in mice." *J Clin Invest* **119**(7): 1858-1870.
- Serinoz, E., M. Varli, et al. (2003). "Nuclear localization of hepatitis B core antigen and its relations to liver injury, hepatocyte proliferation, and viral load." *J Clin Gastroenterol* **36**(3): 269-272.
- Severin, E., E. M. Meier, et al. (1984). "Flow cytometric analysis of mouse hepatocyte ploidy. I. Preparative and mathematical protocol." *Cell Tissue Res* **238**(3): 643-647.
- Shafiei, M. S., S. Shetty, et al. (2011). "Adiponectin regulation of stellate cell activation via PPARgamma-dependent and -independent mechanisms." *Am J Pathol* **178**(6): 2690-2699.
- Shafritz, D. A., D. Shouval, et al. (1981). "Integration of hepatitis B virus DNA into the genome of liver cells in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. Studies in percutaneous liver biopsies and post-mortem tissue specimens." *N Engl J Med* **305**(18): 1067-1073.
- Shah, R., K. Reyes-Gordillo, et al. (2013). "TGF-beta1 up-regulates the expression of PDGF-beta receptor mRNA and induces a delayed PI3K-, AKT-, and p70(S6K) -dependent proliferative response in activated hepatic stellate cells." *Alcohol Clin Exp Res* **37**(11): 1838-1848.
- Shamay, M., R. Agami, et al. (2001). "HBV integrants of hepatocellular carcinoma cell lines contain an active enhancer." *Oncogene* **20**(47): 6811-6819.
- Shan, X., M. Ren, et al. (2015). "Regulation of the microRNA processor DGCR8 by hepatitis B virus proteins via the transcription factor YY1." *Arch Virol* **160**(3): 795-803.
- Sharvit, E., S. Abramovitch, et al. (2013). "Amplified inhibition of stellate cell activation pathways by PPAR-gamma, RAR and RXR agonists." *PLoS One* **8**(10): e76541.
- Sheldon, J., N. Camino, et al. (2005). "Selection of hepatitis B virus polymerase mutations in HIV-coinfected patients treated with tenofovir." *Antivir Ther* **10**(6): 727-734.
- Shera, K. A., C. A. Shera, et al. (2001). "Small tumor virus genomes are integrated near nuclear matrix attachment regions in transformed cells." *J Virol* **75**(24): 12339-12346.
- Shi, Q. and R. W. King (2005). "Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines." *Nature* **437**(7061): 1038-1042.
- Shih, W. L., M. L. Kuo, et al. (2003). "Hepatitis B virus X protein activates a survival signaling by linking SRC to phosphatidylinositol 3-kinase." *J Biol Chem* **278**(34): 31807-31813.
- Shin, G. C., S. H. Ahn, et al. (2013). "Hepatocystin/80K-H inhibits replication of hepatitis B virus through interaction with HBx protein in hepatoma cell." *Biochim Biophys Acta* **1832**(10): 1569-1581.
- Shin Kim, S., S. Yeom, et al. (2016). "Hepatitis B virus X protein induces epithelial-mesenchymal transition by repressing E-cadherin expression via upregulation of E12/E47." *J Gen Virol* **97**(1): 134-143.
- Shintani, Y., H. Yotsuyanagi, et al. (1999). "Induction of apoptosis after switch-on of the hepatitis B virus X gene mediated by the Cre/loxP recombination system." *J Gen Virol* **80** (Pt 12): 3257-3265.
- Shukla, R., J. Yue, et al. (2011). "Proinflammatory cytokine TNF-alpha increases the stability of hepatitis B virus X protein through NF-kappaB signaling." *Carcinogenesis* **32**(7): 978-985.

- Si-Tayeb, K., F. P. Lemaigre, et al. (2010). "Organogenesis and development of the liver." *Dev Cell* **18**(2): 175-189.
- Sia, D., Y. Hoshida, et al. (2013). "Integrative molecular analysis of intrahepatic cholangiocarcinoma reveals 2 classes that have different outcomes." *Gastroenterology* **144**(4): 829-840.
- Sigal, S. H., P. Rajvanshi, et al. (1999). "Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events." *Am J Physiol* **276**(5 Pt 1): G1260-1272.
- Silkworth, W. T., I. K. Nardi, et al. (2009). "Multipolar spindle pole coalescence is a major source of kinetochore mis-attachment and chromosome mis-segregation in cancer cells." *PLoS One* **4**(8): e6564.
- Simerzin, A., E. Zorde-Khvaleyevsky, et al. (2016). "The liver-specific microRNA-122*, the complementary strand of microRNA-122, acts as a tumor suppressor by modulating the p53/mouse double minute 2 homolog circuitry." *Hepatology* **64**(5): 1623-1636.
- Sir, D., Y. Tian, et al. (2010). "The early autophagic pathway is activated by hepatitis B virus and required for viral DNA replication." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(9): 4383-4388.
- Sirma, H., C. Giannini, et al. (1999). "Hepatitis B virus X mutants, present in hepatocellular carcinoma tissue abrogate both the antiproliferative and transactivation effects of HBx." *Oncogene* **18**(34): 4848-4859.
- Sirma, H., R. Weil, et al. (1998). "Cytosol is the prime compartment of hepatitis B virus X protein where it colocalizes with the proteasome." *Oncogene* **16**(16): 2051-2063.
- Sitterlin, D., F. Bergametti, et al. (2000). "Correct binding of viral X protein to UVDDDB-p127 cellular protein is critical for efficient infection by hepatitis B viruses." *Oncogene* **19**(38): 4427-4431.
- Sitterlin, D., T. H. Lee, et al. (1997). "Interaction of the UV-damaged DNA-binding protein with hepatitis B virus X protein is conserved among mammalian hepadnaviruses and restricted to transactivation-proficient X-insertion mutants." *J Virol* **71**(8): 6194-6199.
- Slagsvold, T., K. Pattni, et al. (2006). "Endosomal and non-endosomal functions of ESCRT proteins." *Trends Cell Biol* **16**(6): 317-326.
- Smith, J., L. M. Tho, et al. (2010). "The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer." *Adv Cancer Res* **108**: 73-112.
- Sohn, S. Y., S. B. Kim, et al. (2006). "Negative regulation of hepatitis B virus replication by cellular Hsp40/DnaJ proteins through destabilization of viral core and X proteins." *J Gen Virol* **87**(Pt 7): 1883-1891.
- Soussan, P., F. Garreau, et al. (2000). "In vivo expression of a new hepatitis B virus protein encoded by a spliced RNA." *J Clin Invest* **105**(1): 55-60.
- Soussan, P., J. Pol, et al. (2008). "Expression of defective hepatitis B virus particles derived from singly spliced RNA is related to liver disease." *J Infect Dis* **198**(2): 218-225.
- Souza, B. S., G. L. Sampaio, et al. (2016). "Zika virus infection induces mitosis abnormalities and apoptotic cell death of human neural progenitor cells." *Sci Rep* **6**: 39775.
- Sporn, M. B. and K. T. Liby (2012). "NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context." *Nat Rev Cancer* **12**(8): 564-571.

- Stahl, M., M. Retzlaff, et al. (2007). "Chaperone activation of the hepadnaviral reverse transcriptase for template RNA binding is established by the Hsp70 and stimulated by the Hsp90 system." *Nucleic Acids Res* **35**(18): 6124-6136.
- Stenberg, P., M. Lundmark, et al. (2003). "Evolution of clonality and polyploidy in a weevil system." *Mol Biol Evol* **20**(10): 1626-1632.
- Stewart, Z. A., M. D. Westfall, et al. (2003). "Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy." *Trends Pharmacol Sci* **24**(3): 139-145.
- Stocker, E., H. K. Wullstein, et al. (1973). "[Capacity of regeneration in liver epithelia of juvenile, repeated partially hepatectomized rats. Autoradiographic studies after continuous infusion of 3H-thymidine (author's transl)]." *Virchows Arch B Cell Pathol* **14**(2): 93-103.
- Stoop, J. N., R. G. van der Molen, et al. (2005). "Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection." *Hepatology* **41**(4): 771-778.
- Stray, S. J. and A. Zlotnick (2006). "BAY 41-4109 has multiple effects on Hepatitis B virus capsid assembly." *J Mol Recognit* **19**(6): 542-548.
- Stross, L., J. Gunther, et al. (2012). "Foxp3+ regulatory T cells protect the liver from immune damage and compromise virus control during acute experimental hepatitis B virus infection in mice." *Hepatology* **56**(3): 873-883.
- Studach, L., W. H. Wang, et al. (2010). "Polo-like kinase 1 activated by the hepatitis B virus X protein attenuates both the DNA damage checkpoint and DNA repair resulting in partial polyploidy." *J Biol Chem* **285**(39): 30282-30293.
- Studach, L. L., L. Rakotomalala, et al. (2009). "Polo-like kinase 1 inhibition suppresses hepatitis B virus X protein-induced transformation in an in vitro model of liver cancer progression." *Hepatology* **50**(2): 414-423.
- Su, F. and R. J. Schneider (1997). "Hepatitis B virus HBx protein sensitizes cells to apoptotic killing by tumor necrosis factor alpha." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(16): 8744-8749.
- Su, I. J., H. C. Wang, et al. (2008). "Ground glass hepatocytes contain pre-S mutants and represent preneoplastic lesions in chronic hepatitis B virus infection." *J Gastroenterol Hepatol* **23**(8 Pt 1): 1169-1174.
- Su, Q. and P. Bannasch (2003). "Relevance of hepatic preneoplasia for human hepatocarcinogenesis." *Toxicol Pathol* **31**(1): 126-133.
- Su, Q., C. H. Schroder, et al. (1998). "Expression of hepatitis B virus X protein in HBV-infected human livers and hepatocellular carcinomas." *Hepatology* **27**(4): 1109-1120.
- Su, T. S., C. J. Lai, et al. (1989). "Hepatitis B virus transcript produced by RNA splicing." *J Virol* **63**(9): 4011-4018.
- Summers, J., A. R. Jilbert, et al. (2003). "Hepatocyte turnover during resolution of a transient hepadnaviral infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(20): 11652-11659.
- Summers, J., J. M. Smolec, et al. (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.
- Sun, W., Q. Su, et al. (2014). "High expression of polo-like kinase 1 is associated with early development of hepatocellular carcinoma." *Int J Genomics* **2014**: 312130.
- Sung, J. J., J. Y. Lai, et al. (2008). "Lamivudine compared with lamivudine and adefovir dipivoxil for the treatment of HBeAg-positive chronic hepatitis B." *J Hepatol* **48**(5): 728-735.

- Sung, W. K., H. Zheng, et al. (2012). "Genome-wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma." *Nat Genet* **44**(7): 765-769.
- Sureau, C. and J. Salisse (2013). "A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus a-determinant." *Hepatology* **57**(3): 985-994.
- Sze, K. M., G. K. Chu, et al. (2013). "C-terminal truncated hepatitis B virus x protein is associated with metastasis and enhances invasiveness by C-Jun/matrix metalloproteinase protein 10 activation in hepatocellular carcinoma." *Hepatology* **57**(1): 131-139.
- Takada, S., Y. Shirakata, et al. (1999). "Association of hepatitis B virus X protein with mitochondria causes mitochondrial aggregation at the nuclear periphery, leading to cell death." *Oncogene* **18**(50): 6965-6973.
- Talwani, R., B. L. Gilliam, et al. (2011). "Infectious diseases and the liver." *Clin Liver Dis* **15**(1): 111-130.
- Tan, W. S. (2002). "Inhibition of hepatitis B virus assembly with synthetic peptides derived from the viral surface and core antigens." *J Gen Appl Microbiol* **48**(2): 103-107.
- Tang, H., L. Da, et al. (2009). "Hepatitis B virus X protein sensitizes cells to starvation-induced autophagy via up-regulation of beclin 1 expression." *Hepatology* **49**(1): 60-71.
- Tang, H., L. Delgermaa, et al. (2005). "The transcriptional transactivation function of HBx protein is important for its augmentation role in hepatitis B virus replication." *J Virol* **79**(9): 5548-5556.
- Taylor, M. V. (2002). "Muscle differentiation: how two cells become one." *Curr Biol* **12**(6): R224-228.
- Tennant, B. C., I. A. Toshkov, et al. (2004). "Hepatocellular carcinoma in the woodchuck model of hepatitis B virus infection." *Gastroenterology* **127**(5 Suppl 1): S283-293.
- Teratani, T., K. Tomita, et al. (2012). "A high-cholesterol diet exacerbates liver fibrosis in mice via accumulation of free cholesterol in hepatic stellate cells." *Gastroenterology* **142**(1): 152-164 e110.
- Thakur, V., R. C. Guptan, et al. (2002). "Profile, spectrum and significance of HBV genotypes in chronic liver disease patients in the Indian subcontinent." *J Gastroenterol Hepatol* **17**(2): 165-170.
- Theise, N. D., R. Saxena, et al. (1999). "The canals of Hering and hepatic stem cells in humans." *Hepatology* **30**(6): 1425-1433.
- Theuerkorn, M., G. Fischer, et al. (2011). "Prolyl cis/trans isomerase signalling pathways in cancer." *Curr Opin Pharmacol* **11**(4): 281-287.
- Thimme, R., S. Wieland, et al. (2003). "CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection." *J Virol* **77**(1): 68-76.
- Thoen, L. F., E. L. Guimaraes, et al. (2011). "A role for autophagy during hepatic stellate cell activation." *J Hepatol* **55**(6): 1353-1360.
- Thomas, M. B. and J. L. Abbruzzese (2005). "Opportunities for targeted therapies in hepatocellular carcinoma." *J Clin Oncol* **23**(31): 8093-8108.
- Tian, Y., W. Yang, et al. (2013). "Hepatitis B virus X protein-induced aberrant epigenetic modifications contributing to human hepatocellular carcinoma pathogenesis." *Mol Cell Biol* **33**(15): 2810-2816.

- Tolle, T. K., D. Glebe, et al. (1998). "Structure and glycosylation patterns of surface proteins from woodchuck hepatitis virus." *J Virol* **72**(12): 9978-9985.
- Tomita, K., T. Teratani, et al. (2014). "Free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells: mechanism of liver fibrosis aggravation in nonalcoholic steatohepatitis in mice." *Hepatology* **59**(1): 154-169.
- Totoki, Y., K. Tatsuno, et al. (2014). "Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes." *Nat Genet* **46**(12): 1267-1273.
- Toyoda, H., O. Bregerie, et al. (2005). "Changes to hepatocyte ploidy and binuclearity profiles during human chronic viral hepatitis." *Gut* **54**(2): 297-302.
- Trakala, M., S. Rodriguez-Acebes, et al. (2015). "Functional reprogramming of polyploidization in megakaryocytes." *Dev Cell* **32**(2): 155-167.
- Tralhao, J. G., J. Roudier, et al. (2002). "Paracrine in vivo inhibitory effects of hepatitis B virus X protein (HBx) on liver cell proliferation: an alternative mechanism of HBx-related pathogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(10): 6991-6996.
- Transy, C., G. Fourel, et al. (1992). "Frequent amplification of c-myc in ground squirrel liver tumors associated with past or ongoing infection with a hepadnavirus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(9): 3874-3878.
- Tremblay, K. D. and K. S. Zaret (2005). "Distinct populations of endoderm cells converge to generate the embryonic liver bud and ventral foregut tissues." *Dev Biol* **280**(1): 87-99.
- Trobonjaca, Z., F. Leithauser, et al. (2001). "Activating immunity in the liver. I. Liver dendritic cells (but not hepatocytes) are potent activators of IFN-gamma release by liver NKT cells." *J Immunol* **167**(3): 1413-1422.
- Tsou, M. F. and T. Stearns (2006). "Controlling centrosome number: licenses and blocks." *Curr Opin Cell Biol* **18**(1): 74-78.
- Tsukamoto, H., H. She, et al. (2006). "Anti-adipogenic regulation underlies hepatic stellate cell transdifferentiation." *J Gastroenterol Hepatol* **21 Suppl 3**: S102-105.
- Tsutsui, T., B. Hesabi, et al. (1999). "Targeted disruption of CDK4 delays cell cycle entry with enhanced p27(Kip1) activity." *Mol Cell Biol* **19**(10): 7011-7019.
- Tu, H., C. Bonura, et al. (2001). "Biological impact of natural COOH-terminal deletions of hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma tissues." *Cancer Res* **61**(21): 7803-7810.
- Tu, T., M. A. Budzinska, et al. (2015). "Conceptual models for the initiation of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma." *Liver Int* **35**(7): 1786-1800.
- Tu, T., W. S. Mason, et al. (2015). "Clonal expansion of hepatocytes with a selective advantage occurs during all stages of chronic hepatitis B virus infection." *J Viral Hepat* **22**(9): 737-753.
- Twist, E. M., H. F. Clark, et al. (1981). "Integration pattern of hepatitis B virus DNA sequences in human hepatoma cell lines." *J Virol* **37**(1): 239-243.
- Uchida, T., T. Saitoh, et al. (1997). "Mutations of the X region of hepatitis B virus and their clinical implications." *Pathol Int* **47**(4): 183-193.
- Ueberham, E., E. Arendt, et al. (2004). "Reduction and expansion of the glutamine synthetase expressing zone in livers from tetracycline controlled TGF-beta1 transgenic mice and multiple starved mice." *J Hepatol* **41**(1): 75-81.

- Ueda, H., S. J. Ullrich, et al. (1995). "Functional inactivation but not structural mutation of p53 causes liver cancer." *Nat Genet* **9**(1): 41-47.
- Uetake, Y. and G. Sluder (2004). "Cell cycle progression after cleavage failure: mammalian somatic cells do not possess a "tetraploidy checkpoint"." *J Cell Biol* **165**(5): 609-615.
- Ullah, Z., M. J. Kohn, et al. (2008). "Differentiation of trophoblast stem cells into giant cells is triggered by p57/Kip2 inhibition of CDK1 activity." *Genes Dev* **22**(21): 3024-3036.
- Uprichard, S. L., S. F. Wieland, et al. (2003). "Transcriptional and posttranscriptional control of hepatitis B virus gene expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(3): 1310-1315.
- Urban, S., R. Bartenschlager, et al. (2014). "Strategies to inhibit entry of HBV and HDV into hepatocytes." *Gastroenterology* **147**(1): 48-64.
- van Attikum, H. and S. M. Gasser (2009). "Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response." *Trends Cell Biol* **19**(5): 207-217.
- van Breugel, P. C., E. I. Robert, et al. (2012). "Hepatitis B virus X protein stimulates gene expression selectively from extrachromosomal DNA templates." *Hepatology* **56**(6): 2116-2124.
- Van de Peer, Y., S. Maere, et al. (2009). "The evolutionary significance of ancient genome duplications." *Nat Rev Genet* **10**(10): 725-732.
- van de Vijver, M. J., Y. D. He, et al. (2002). "A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer." *N Engl J Med* **347**(25): 1999-2009.
- van der Heijden, F. L. and J. James (1975). "Polyploidy in the human myometrium." *Z Mikrosk Anat Forsch* **89**(1): 18-26.
- van der Sande, M. A., M. Mendy, et al. (2007). "Similar long-term vaccine efficacy of two versus three doses of HBV vaccine in early life." *Vaccine* **25**(8): 1509-1512.
- van der Sande, M. A., P. Waight, et al. (2006). "Long-term protection against carriage of hepatitis B virus after infant vaccination." *J Infect Dis* **193**(11): 1528-1535.
- Van Hul, N., N. Lanthier, et al. (2011). "Kupffer cells influence parenchymal invasion and phenotypic orientation, but not the proliferation, of liver progenitor cells in a murine model of liver injury." *Am J Pathol* **179**(4): 1839-1850.
- Van Rooyen, D. M., L. T. Gan, et al. (2013). "Pharmacological cholesterol lowering reverses fibrotic NASH in obese, diabetic mice with metabolic syndrome." *J Hepatol* **59**(1): 144-152.
- Varetti, G. and D. Pellman (2012). ""Two" much of a good thing: telomere damage-induced genome doubling drives tumorigenesis." *Cancer Cell* **21**(6): 712-714.
- Venook, A. P., C. Papandreou, et al. (2010). "The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective." *Oncologist* **15 Suppl 4**: 5-13.
- Vignery, A. (2000). "Osteoclasts and giant cells: macrophage-macrophage fusion mechanism." *Int J Exp Pathol* **81**(5): 291-304.
- Vignery, A. (2008). "Macrophage fusion: molecular mechanisms." *Methods Mol Biol* **475**: 149-161.
- Villanueva, A., D. Y. Chiang, et al. (2008). "Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma." *Gastroenterology* **135**(6): 1972-1983, 1983 e1971-1911.
- Villanueva, A., Y. Hoshida, et al. (2011). "Combining clinical, pathology, and gene expression data to predict recurrence of hepatocellular carcinoma." *Gastroenterology* **140**(5): 1501-1512 e1502.

- Villanueva, A., A. Portela, et al. (2015). "DNA methylation-based prognosis and epidrivers in hepatocellular carcinoma." *Hepatology* **61**(6): 1945-1956.
- Vitrat, N., K. Cohen-Solal, et al. (1998). "Endomitosis of human megakaryocytes are due to abortive mitosis." *Blood* **91**(10): 3711-3723.
- Vitre, B. D. and D. W. Cleveland (2012). "Centrosomes, chromosome instability (CIN) and aneuploidy." *Curr Opin Cell Biol* **24**(6): 809-815.
- Vliegen, H. W., F. Eulderink, et al. (1995). "Polyploidy of myocyte nuclei in pressure overloaded human hearts: a flow cytometric study in left and right ventricular myocardium." *Am J Cardiovasc Pathol* **5**(1): 27-31.
- Volz, T., L. Allweiss, et al. (2013). "The entry inhibitor Myrcludex-B efficiently blocks intrahepatic virus spreading in humanized mice previously infected with hepatitis B virus." *J Hepatol* **58**(5): 861-867.
- Wang, C., W. Yang, et al. (2012). "Hepatitis B virus X (HBx) induces tumorigenicity of hepatic progenitor cells in 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine-treated HBx transgenic mice." *Hepatology* **55**(1): 108-120.
- Wang, H. and W. S. Ryu (2010). "Hepatitis B virus polymerase blocks pattern recognition receptor signaling via interaction with DDX3: implications for immune evasion." *PLoS Pathog* **6**(7): e1000986.
- Wang, H. C., H. C. Wu, et al. (2003). "Different types of ground glass hepatocytes in chronic hepatitis B virus infection contain specific pre-S mutants that may induce endoplasmic reticulum stress." *Am J Pathol* **163**(6): 2441-2449.
- Wang, H. D., A. Trivedi, et al. (1998). "Regulation of RNA polymerase I-dependent promoters by the hepatitis B virus X protein via activated Ras and TATA-binding protein." *Mol Cell Biol* **18**(12): 7086-7094.
- Wang, J., X. Chenivresse, et al. (1990). "Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma." *Nature* **343**(6258): 555-557.
- Wang, J., T. Shen, et al. (2016). "Serum hepatitis B virus RNA is encapsidated pregenome RNA that may be associated with persistence of viral infection and rebound." *J Hepatol* **65**(4): 700-710.
- Wang, J., F. Zindy, et al. (1992). "Modification of cyclin A expression by hepatitis B virus DNA integration in a hepatocellular carcinoma." *Oncogene* **7**(8): 1653-1656.
- Wang, K., H. Y. Lim, et al. (2013). "Genomic landscape of copy number aberrations enables the identification of oncogenic drivers in hepatocellular carcinoma." *Hepatology* **58**(2): 706-717.
- Wang, M. J., F. Chen, et al. (2017). "Hepatocyte polyploidization and its association with pathophysiological processes." *Cell Death Dis* **8**(5): e2805.
- Wang, M. J., F. Chen, et al. (2014). "Reversal of hepatocyte senescence after continuous in vivo cell proliferation." *Hepatology* **60**(1): 349-361.
- Wang, Q., W. Zhang, et al. (2010). "A mutant of hepatitis B virus X protein (HBxDelta127) promotes cell growth through a positive feedback loop involving 5-lipoxygenase and fatty acid synthase." *Neoplasia* **12**(2): 103-115.
- Wang, W. L., W. T. London, et al. (1991). "HBxAg in the liver from carrier patients with chronic hepatitis and cirrhosis." *Hepatology* **14**(1): 29-37.

- Wang, X. W., M. K. Gibson, et al. (1995). "Abrogation of p53-induced apoptosis by the hepatitis B virus X gene." *Cancer Res* **55**(24): 6012-6016.
- Wang, Y., Y. Lu, et al. (2010). "Lethal-7 is down-regulated by the hepatitis B virus x protein and targets signal transducer and activator of transcription 3." *J Hepatol* **53**(1): 57-66.
- Wanzel, M., S. Herold, et al. (2003). "Transcriptional repression by Myc." *Trends Cell Biol* **13**(3): 146-150.
- Weber, L. W., M. Boll, et al. (2003). "Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model." *Crit Rev Toxicol* **33**(2): 105-136.
- Wei, C., C. Ni, et al. (2010). "The hepatitis B virus X protein disrupts innate immunity by downregulating mitochondrial antiviral signaling protein." *J Immunol* **185**(2): 1158-1168.
- Wei, Y., D. Liu, et al. (2008). "Identification of beta-1,4-galactosyltransferase I as a target gene of HBx-induced cell cycle progression of hepatoma cell." *J Hepatol* **49**(6): 1029-1037.
- Wei, Y., J. T. Van Nhieu, et al. (2002). "Altered expression of E-cadherin in hepatocellular carcinoma: correlations with genetic alterations, beta-catenin expression, and clinical features." *Hepatology* **36**(3): 692-701.
- Wendel, J. F. (2000). "Genome evolution in polyploids." *Plant Mol Biol* **42**(1): 225-249.
- Wentz, M. J., S. A. Becker, et al. (2000). "Dissociation of DDB1-binding and transactivation properties of the hepatitis B virus X protein." *Virus Res* **68**(1): 87-92.
- Westbrook, R. H. and G. Dusheiko (2014). "Natural history of hepatitis C." *J Hepatol* **61**(1 Suppl): S58-68.
- Wheatley, D. N. (1972). "Binucleation in mammalian liver. Studies on the control of cytokinesis in vivo." *Exp Cell Res* **74**(2): 455-465.
- Whittaker, S., R. Marais, et al. (2010). "The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma." *Oncogene* **29**(36): 4989-5005.
- Wieland, S., R. Thimme, et al. (2004). "Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(17): 6669-6674.
- Wiemann, S. U., A. Satyanarayana, et al. (2002). "Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis." *FASEB J* **16**(9): 935-942.
- Wierstra, I. (2013). "FOXO1 (Forkhead box O1) in tumorigenesis: overexpression in human cancer, implication in tumorigenesis, oncogenic functions, tumor-suppressive properties, and target of anticancer therapy." *Adv Cancer Res* **119**: 191-419.
- Wong, V. W., J. Yu, et al. (2009). "High serum interleukin-6 level predicts future hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis B." *Int J Cancer* **124**(12): 2766-2770.
- Wooddell, C. I., D. B. Rozema, et al. (2013). "Hepatocyte-targeted RNAi therapeutics for the treatment of chronic hepatitis B virus infection." *Mol Ther* **21**(5): 973-985.
- Wynne, S. A., A. G. Leslie, et al. (1999). "Crystallization of hepatitis B virus core protein shells: determination of cryoprotectant conditions and preliminary X-ray characterization." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55**(Pt 2): 557-560.
- Xia, L., W. Huang, et al. (2012). "Upregulated FoxO1 expression induced by hepatitis B virus X protein promotes tumor metastasis and indicates poor prognosis in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma." *J Hepatol* **57**(3): 600-612.

- Xu, C., H. Guo, et al. (2010). "Interferons accelerate decay of replication-competent nucleocapsids of hepatitis B virus." *J Virol* **84**(18): 9332-9340.
- Yamada, T., K. Sogawa, et al. (1998). "Increased polyploidy, delayed mitosis and reduced protein phosphatase-1 activity associated with excess copper in the Long Evans Cinnamon rat." *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* **99**(3): 283-304.
- Yamashita, T., M. Forgues, et al. (2008). "EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma." *Cancer Res* **68**(5): 1451-1461.
- Yamashita, T. and X. W. Wang (2013). "Cancer stem cells in the development of liver cancer." *J Clin Invest* **123**(5): 1911-1918.
- Yan, H., B. Peng, et al. (2013). "Molecular determinants of hepatitis B and D virus entry restriction in mouse sodium taurocholate cotransporting polypeptide." *J Virol* **87**(14): 7977-7991.
- Yan, H., G. Zhong, et al. (2012). "Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus." *Elife* **3**.
- Yang, D., D. J. McCrann, et al. (2007). "Increased polyploidy in aortic vascular smooth muscle cells during aging is marked by cellular senescence." *Aging Cell* **6**(2): 257-260.
- Yang, H. C. and J. H. Kao (2015). "Viral hepatitis. HBV cure--can we pin our hopes on immunotherapy?" *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **12**(3): 129-131.
- Yang, L., J. He, et al. (2009). "Hepatitis B virus X protein upregulates expression of SMYD3 and C-MYC in HepG2 cells." *Med Oncol* **26**(4): 445-451.
- Yang, W. and J. Summers (1999). "Integration of hepadnavirus DNA in infected liver: evidence for a linear precursor." *J Virol* **73**(12): 9710-9717.
- Yang, W. J., C. J. Chang, et al. (2009). "Hepatitis B virus X protein enhances the transcriptional activity of the androgen receptor through c-Src and glycogen synthase kinase-3beta kinase pathways." *Hepatology* **49**(5): 1515-1524.
- Yang, Z., L. Zhuang, et al. (2016). "Naturally occurring basal core promoter A1762T/G1764A dual mutations increase the risk of HBV-related hepatocellular carcinoma: a meta-analysis." *Oncotarget* **7**(11): 12525-12536.
- Yeh, C. T., Y. F. Liaw, et al. (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, C. T., S. W. Wong, et al. (1993). "Cell cycle regulation of nuclear localization of hepatitis B virus core protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(14): 6459-6463.
- Yeo, W., N. Wong, et al. (2005). "High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A in tumor and plasma of patients with hepatocellular carcinoma." *Liver Int* **25**(2): 266-272.
- Yi, H. S., Y. S. Lee, et al. (2014). "Alcohol dehydrogenase III exacerbates liver fibrosis by enhancing stellate cell activation and suppressing natural killer cells in mice." *Hepatology* **60**(3): 1044-1053.
- Yip, W. K., A. S. Cheng, et al. (2011). "Carboxyl-terminal truncated HBx regulates a distinct microRNA transcription program in hepatocellular carcinoma development." *PLoS One* **6**(8): e22888.
- Yona, S., K. W. Kim, et al. (2013). "Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis." *Immunity* **38**(1): 79-91.

- Yoo, Y. D., H. Ueda, et al. (1996). "Regulation of transforming growth factor-beta 1 expression by the hepatitis B virus (HBV) X transactivator. Role in HBV pathogenesis." J Clin Invest **97**(2): 388-395.
- Yoo, Y. G., T. Y. Na, et al. (2008). "Hepatitis B virus X protein induces the expression of MTA1 and HDAC1, which enhances hypoxia signaling in hepatocellular carcinoma cells." Oncogene **27**(24): 3405-3413.
- Yoo, Y. G., S. H. Oh, et al. (2003). "Hepatitis B virus X protein enhances transcriptional activity of hypoxia-inducible factor-1alpha through activation of mitogen-activated protein kinase pathway." J Biol Chem **278**(40): 39076-39084.
- Yoshida, T., T. Hisamoto, et al. (2006). "Spreds, inhibitors of the Ras/ERK signal transduction, are dysregulated in human hepatocellular carcinoma and linked to the malignant phenotype of tumors." Oncogene **25**(45): 6056-6066.
- Yu, F. L., H. J. Liu, et al. (2005). "Hepatitis B virus X protein promotes cell migration by inducing matrix metalloproteinase-3." J Hepatol **42**(4): 520-527.
- Yu, G., X. Chen, et al. (2016). "MiR-19a, miR-122 and miR-223 are differentially regulated by hepatitis B virus X protein and involve in cell proliferation in hepatoma cells." J Transl Med **14**(1): 122.
- Yu, J., H. Y. Zhang, et al. (2003). "Methylation profiling of twenty four genes and the concordant methylation behaviours of nineteen genes that may contribute to hepatocellular carcinogenesis." Cell Res **13**(5): 319-333.
- Yu, S., J. Chen, et al. (2010). "Hepatitis B virus polymerase inhibits RIG-I- and Toll-like receptor 3-mediated beta interferon induction in human hepatocytes through interference with interferon regulatory factor 3 activation and dampening of the interaction between TBK1/IKKepsilon and DDX3." J Gen Virol **91**(Pt 8): 2080-2090.
- Yuan, K., Z. Lian, et al. (2012). "Role of miR-148a in hepatitis B associated hepatocellular carcinoma." PLoS One **7**(4): e35331.
- Yue, X., F. Yang, et al. (2011). "Induction of cyclooxygenase-2 expression by hepatitis B virus depends on demethylation-associated recruitment of transcription factors to the promoter." Virology **8**: 118.
- Yuen, M. F., D. K. Wong, et al. (2004). "HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B in the Chinese: virological, histological, and clinical aspects." Hepatology **39**(6): 1694-1701.
- Yuh, C. H., Y. L. Chang, et al. (1992). "Transcriptional regulation of precore and pregenomic RNAs of hepatitis B virus." J Virol **66**(7): 4073-4084.
- Zanet, J., A. Freije, et al. (2010). "A mitosis block links active cell cycle with human epidermal differentiation and results in endoreplication." PLoS One **5**(12): e15701.
- Zaret, K. S. and M. Grompe (2008). "Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas." Science **322**(5907): 1490-1494.
- Zhang, B., S. Han, et al. (2017). "Hepatitis B virus X protein-mediated non-coding RNA aberrations in the development of human hepatocellular carcinoma." Exp Mol Med **49**(2): e293.
- Zhang, F., C. Ni, et al. (2012). "Ligustrazine attenuates oxidative stress-induced activation of hepatic stellate cells by interrupting platelet-derived growth factor-beta receptor-mediated ERK and p38 pathways." Toxicol Appl Pharmacol **265**(1): 51-60.

- Zhang, S., Q. Chen, et al. (2017). "Hippo Signaling Suppresses Cell Ploidy and Tumorigenesis through Skp2." *Cancer Cell* **31**(5): 669-684 e667.
- Zhang, T., J. Zhang, et al. (2012). "Hepatitis B virus X protein modulates oncogene Yes-associated protein by CREB to promote growth of hepatoma cells." *Hepatology* **56**(6): 2051-2059.
- Zhang, X., X. You, et al. (2012). "Hepatitis B virus X protein drives multiple cross-talk cascade loops involving NF-kappaB, 5-LOX, OPN and Capn4 to promote cell migration." *PLoS One* **7**(2): e31458.
- Zhang, X. Y., C. G. Hu, et al. (2010). "Tetraploidization of diploid *Dioscorea* results in activation of the antioxidant defense system and increased heat tolerance." *J Plant Physiol* **167**(2): 88-94.
- Zhang, Z., U. Protzer, et al. (2004). "Inhibition of cellular proteasome activities enhances hepadnavirus replication in an HBX-dependent manner." *J Virol* **78**(9): 4566-4572.
- Zhang, Z., S. Zhang, et al. (2011). "Hypercytolytic activity of hepatic natural killer cells correlates with liver injury in chronic hepatitis B patients." *Hepatology* **53**(1): 73-85.
- Zheng, D. L., L. Zhang, et al. (2009). "Epigenetic modification induced by hepatitis B virus X protein via interaction with de novo DNA methyltransferase DNMT3A." *J Hepatol* **50**(2): 377-387.
- Zhou, S. and D. N. Standring (1992). "Hepatitis B virus capsid particles are assembled from core-protein dimer precursors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(21): 10046-10050.
- Zhu, Y., Y. Jin, et al. (2010). "Comparison study on the complete sequence of hepatitis B virus identifies new mutations in core gene associated with hepatocellular carcinoma." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **19**(10): 2623-2630.
- Zhu, Y. Z., R. Zhu, et al. (2010). "Hepatitis B virus X protein induces hypermethylation of p16(INK4A) promoter via DNA methyltransferases in the early stage of HBV-associated hepatocarcinogenesis." *J Viral Hepat* **17**(2): 98-107.
- Zilfou, J. T. and S. W. Lowe (2009). "Tumor suppressive functions of p53." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**(5): a001883.
- Zimmet, J. and K. Ravid (2000). "Polyploidy: occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system." *Exp Hematol* **28**(1): 3-16.
- Zitouni, S., C. Nabais, et al. (2014). "Polo-like kinases: structural variations lead to multiple functions." *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**(7): 433-452.
- Zlotnick, A., N. Cheng, et al. (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.
- Zoulim, F. and S. Locarnini (2009). "Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues." *Gastroenterology* **137**(5): 1593-1608 e1591-1592.
- Zucman-Rossi, J. (2010). "Molecular classification of hepatocellular carcinoma." *Dig Liver Dis* **42 Suppl 3**: S235-241.

La protéine HBx du virus de l'hépatite B (VHB) joue un rôle important dans le développement du carcinome hépatocellulaire (CHC). Cependant, les mécanismes par lesquels, HBx favorise l'instabilité génétique au cours de la prolifération du foie restent mal définis. La polyploïdisation des hépatocytes est une caractéristique importante de la prolifération hépatique et favorise la mise en place d'une diversité génétique par des changements dynamiques de chromosomes. La question a été de savoir si la protéine HBx pourrait moduler la polyploïdie hépatique et si par cette stratégie contribuer au développement de la fibrose et/ou du CHC. Pour cela, nous avons utilisé des souris transgéniques (Tg) pour la forme complète de l'HBx (FL-HBx) pour évaluer la polyploïdisation et la prolifération des hépatocytes au cours du développement et de la maladie hépatique (induction de la fibrose par le tétrachlorure de carbone et du CHC par le diéthylnitrosamine). Au cours du développement postnatal aussi bien que dans la maladie hépatique, la protéine FL-HBx inhibe la binucléation hépatique et induit la génération précoce de noyaux polyplôïdes ($\geq 4n$). Ceci est associé à la dérégulation des transitions G1/S et G2/M et à la propagation de dommages à l'ADN. De façon intéressante, nous avons observé une dérégulation similaire de la polyploïdisation des hépatocytes humains dans des souris avec un foie humanisé et infecté par le VHB. Dans les animaux Tg FL-HBx, l'initiation du CHC est associée à l'inactivation du point de contrôle du cycle cellulaire ChK1, l'inhibition de Mre11, Rad51 (protéines de réparation de l'ADN) et de l'apoptose et à la surexpression de l'IL-6 tandis qu'au cours de la fibrose, une augmentation de l'expression de α -sma, PdgfR- β , TGF- β , TNF- α et une perte de l'expression de la glutamine synthétase ont été observées. De plus, les souris Tg FL-HBx traitées présentent une altération plus prononcée du cycle cellulaire des hépatocytes associée à une forte expression de marqueurs de cellules progénitrices tumorales (Ly6D, GpC3, AFP). En conclusion, nos résultats montrent que la protéine FL-HBx induit une polyploïdisation pathologique des hépatocytes par la surexpression de PLK1 via l'activation des voies p38/ERK Mapks. Ceci conduit à la propagation de dommages à l'ADN et à l'apparition de cellules exprimant des marqueurs tumoraux au cours de la fibrose hépatique et de l'initiation du CHC.

Mots-clés : VHB, HBx, Polyploïdie, Foie, Fibrose, Carcinome hépatocellulaire.

Hepatitis B virus X protein (HBx) is involved in the development of hepatocellular carcinoma (HCC). However, how HBx promotes genetic instability or DNA damage during liver proliferation remains unclear. For that, we investigated the impact of HBx expression on hepatocyte polyploidization during liver proliferation and its contribution to fibrosis and HCC development. Mice transgenic for the full-length HBx (FL-HBx) were used to evaluate polyploidization and proliferation of hepatocytes during development and liver disease (fibrosis : carbon tetrachloride and HCC : diethyl nitrosamine, treatments). During postnatal liver development as well as in liver disease, FL-HBx inhibits liver binucleation and triggers early production of polyploid nuclei ($\geq 4n$). These features were associated with aberrant G1/S and G2/M transitions and the propagation of DNA damage. Furthermore, hepatitis B virus infection, in a mouse model of human hepatocytes proliferation, shows similar deregulation of hepatocytes polyploidization. In FL-HBx animals, HCC initiation was associated with impairment of ChK1 activation and Mre11 and Rad51 expression (DNA repair proteins), inhibited apoptosis and upregulated IL-6 transcription while in fibrosis, increased expression of α -sma, PdgfR- β , TGF- β , TNF- α as well as a defect in glutamine synthetase expression were observed. In addition, treated FL-HBx animals displayed marked alterations to the cell cycle associated with stronger expression of HCC progenitor cell markers (Ly6D, GpC3, AFP). Finally, we showed that FL-HBx protein induces pathological polyploidization of hepatocytes by upregulating PLK1 through p38/ERK Mapks pathways. That promotes a loss of genomic integrity and an increase of hepatocytes expressing tumor progenitor cell markers during liver fibrosis and HCC initiation.

Key words : HBV, HBx, Polyploidy, Liver, Fibrosis, Hepatocellular carcinoma.