



**HAL**  
open science

# Identification du récepteur nucléaire des acides biliaires FXR alpha comme facteur proviral pour le virus de l'hépatite B

Karim Mouzannar

► **To cite this version:**

Karim Mouzannar. Identification du récepteur nucléaire des acides biliaires FXR alpha comme facteur proviral pour le virus de l'hépatite B. Virologie. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1098 . tel-01878198

**HAL Id: tel-01878198**

**<https://theses.hal.science/tel-01878198>**

Submitted on 20 Sep 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.



N°d'ordre NNT : 2018LYSE1098

**THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON**  
opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**École Doctorale**  
**BIOLOGIE MOLECULAIRE INTEGRATIVE ET CELLULAIRE**

Soutenue publiquement le 15 juin 2018

par

**Karim MOUZANNAR**

---

**Identification du récepteur nucléaire  
des acides biliaires FXR $\alpha$  comme  
facteur proviral pour le virus de  
l'hépatite B**

---

Devant le jury composé de :

ROINGEARD, Philippe	PU-PH	Université de Tours	Rapporteur
SOUSSAN, Patrick	MCU-PH	Université Paris VI	Rapporteur
INCHAUSPÉ, Geneviève	DR	Transgene SA	Examinatrice
MARGOTTIN-GOGUET, Florence	DR	INSERM Paris	Examinatrice
RAMIÈRE, Christophe	MCU-PH	Université Lyon I	Examineur
ANDRÉ, Patrice	PU-PH	Université Lyon I	Directeur de thèse



# PRÉAMBULE



# I. COMPOSITION DE L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD – LYON I

## **Président de l'Université**

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

## **M. le Professeur Frédéric FLEURY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

## ***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Éducation

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

## II. RÉSUMÉ

L'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) est un problème de santé publique majeur avec plus de 257 millions de porteurs chroniques dans le monde ayant un risque important de développer une cirrhose et/ou un hépatocarcinome. L'histoire naturelle de l'infection est très différente selon l'âge auquel l'infection est contractée. Alors que chez l'adulte l'infection est spontanément résolutive dans la majorité des cas, la contamination materno-infantile ou en bas âge aboutit le plus souvent à une infection chronique. Le cccDNA est la forme de persistance du génome viral dans les hépatocytes infectés et la base de transcription de tous les ARN viraux. La protéine virale HBx joue un rôle crucial dans le recrutement des facteurs épigénétiques sur le cccDNA et favorise son activité transcriptionnelle. Les traitements actuels à base d'interféron et d'analogues nucléos(t)idiques ne permettent pas l'éradication du cccDNA et leur interruption est presque toujours suivie d'une réactivation de la réplication du virus. De nouvelles molécules thérapeutiques ciblant le cccDNA sont donc nécessaires pour espérer obtenir une cure fonctionnelle chez les patients chroniquement infectés.

Il existe des liens étroits entre l'infection par le VHB et le métabolisme des acides biliaires (AB). Ainsi, notre équipe a précédemment montré que le récepteur nucléaire des acides biliaires, le farnésoid X receptor alpha (FXR $\alpha$ ) se fixe sur deux éléments de réponse présents dans la région Enhancer II - promoteur de Core du génome viral et module son activité transcriptionnelle. De plus, le VHB et les AB entrent en compétition pour le même récepteur d'entrée hépatocytaire NTCP, modifiant la concentration cellulaire des AB avec des conséquences sur la fonction et l'expression de FXR $\alpha$ . Enfin, HBx interagit avec FXR $\alpha$  et modifie son activité.

Au cours de cette thèse nous avons dans un premier temps identifié une régulation réciproque existante entre la réplication du VHB et FXR $\alpha$ . Puis nous avons montré *in vitro*, dans des cellules HepaRG différenciées et des hépatocytes primaires humains, que FXR $\alpha$  est un facteur proviral pour le VHB et que les agonistes de FXR $\alpha$  inhibent l'expression de l'ensemble des marqueurs viraux de manière dépendante ou indépendante de la protéine virale HBx. Enfin, dans un modèle *in vivo* de souris C3H/HeN transduites par un vecteur recombinant AAV2/8-VHB, nous avons obtenu l'effet inhibiteur des agonistes de FXR $\alpha$  mais uniquement chez les souris adultes et pas chez les souris jeunes. Compte tenu de l'évolution de la flore intestinale avec l'âge et de son importance dans le métabolisme des AB, ces résultats suggèrent que le fort taux d'évolution chronique chez les jeunes enfants pourrait être lié à l'immaturité du métabolisme des AB.

La mise en évidence d'un lien entre microbiote, métabolisme des AB et infection par le VHB contribuerait grandement à une meilleure compréhension de l'histoire naturelle de cette infection. De plus, l'identification de FXR $\alpha$  comme un facteur de l'hôte favorisant l'infection et l'existence de molécules capables de moduler l'activité de FXR $\alpha$  suggèrent que FXR $\alpha$  pourrait constituer une cible thérapeutique intéressante ciblant le cccDNA et permettant d'améliorer le traitement des patients infectés par le VHB.

**Mots-clefs :** VHB, cccDNA, HBx, FXR $\alpha$ , acides biliaires.

## ABSTRACT

Hepatitis B virus (HBV) infection is a major global health problem with more than 257 million chronic carriers worldwide that remain at significant risk for developing cirrhosis and/or hepatocellular carcinoma. The natural history of infection is very different depending on the age at which the infection is contracted. Whereas in adults most HBV infections spontaneously resolve, in infants and young children they usually result in chronic infection. cccDNA is the molecular form of viral persistence in infected hepatocytes and serves as a transcription template for all viral RNAs. The viral protein HBx plays a crucial role in the recruitment of epigenetic factors to the cccDNA and promotes its transcriptional activity. Currently, interferon and nucleot(s)ide analogues are the first-line agents in the treatment of chronic hepatitis B without allowing eradication of cccDNA and their interruption are almost always followed by a reactivation of the replication of the virus. New therapeutic molecules targeting cccDNA are therefore needed to hope for a functional cure in chronically infected patients.

HBV infection and bile acid (BA) metabolism are tightly linked. Therefore, our team has previously shown that the bile acid nuclear receptor, the farnesoid X receptor alpha (FXR $\alpha$ ) bind to two response elements present in the Enhancer II - Core promoter region of HBV genome and modulate its transcriptional activity. Moreover, HBV and BA compete for the same entry receptor of hepatocytes NTCP and modify BA cell concentration with consequences on the function and expression of FXR $\alpha$ . Finally, HBx interacts with FXR $\alpha$  and modify its activity.

During my PhD, we have first identified a reciprocal regulation between HBV replication and FXR $\alpha$ . Second, we have showed *in vitro*, in HepaRG differentiated cells and in primary human hepatocytes, that FXR $\alpha$  is a proviral factor for HBV and that FXR $\alpha$  agonists inhibit the expression of all HBV markers in a dependent or independent manner of the viral protein HBx. Finally, in an *in vivo* model of C3H/HeN mice transduced with a recombinant AAV2/8-HBV vector, we obtained the inhibitory effect of FXR $\alpha$  agonists but only in adult and not in young mice. Considering the evolution of the gut flora with age and its importance in the metabolism of BA, these results suggest that the high rate of chronic progression in young children might be related to the immaturity of BA metabolism.

The identification of a link between BA metabolism, gut microbiome composition and evolution of HBV infection will represent a big step toward the understanding of HBV natural history. Moreover, the identification of FXR $\alpha$  as a proviral factor for HBV and the capacity of FXR $\alpha$  ligands to modulate the transcriptional activity of cccDNA suggest that FXR $\alpha$  ligands might represent a new class of molecules with the aim to obtain functional cure for HBV infected patients.

**Keywords:** HBV, cccDNA, HBx, FXR $\alpha$ , bile acids.

### III. SOMMAIRE

<b>PRÉAMBULE</b> .....	<b>3</b>
<b>I. COMPOSITION DE L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD – LYON I</b> .....	<b>4</b>
<b>II. RÉSUMÉ</b> .....	<b>5</b>
<b>III. SOMMAIRE</b> .....	<b>7</b>
<b>IV. LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>9</b>
<b>V. LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>11</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>16</b>
<b>I. Le virus de l'hépatite B</b> .....	<b>18</b>
1. Classification.....	18
2. Épidémiologie.....	18
3. Répartition géographique et transmission.....	19
4. Génotypes.....	20
5. Génome.....	20
6. Structure de la particule virale.....	21
7. Protéines virales constituant la particule de Dane.....	22
8. Cycle viral.....	23
a. Entrée du virus.....	23
b. Migration de la capsid au noyau.....	24
c. Réparation du rcDNA en cccDNA.....	24
d. Établissement du cccDNA.....	25
1. Structure du cccDNA.....	25
2. Régulation du cccDNA.....	26
a. Régions régulatrices et transcription.....	26
b. L'épissage alternatif des ARN du VHB.....	27
1. L'épissage alternatif de l'ARNpg.....	27
2. La protéine HBSP.....	28
c. Facteurs impliqués dans la régulation du cccDNA.....	29
1. Régulation épigénétique.....	29
2. Régulation par les facteurs métaboliques.....	30
3. Régulation par la protéine virale HBx.....	31
4. Régulation par HBx-DDB1.....	31
5. Régulation par le complexe Smc5/6.....	32
3. Taille du pool du cccDNA.....	33
4. Persistance du cccDNA.....	33
5. Zones d'ombres du cccDNA.....	34
e. Encapsidation et rétrotranscription.....	34
f. Sortie du virus et des particules sous-virales.....	36
9. Histoire naturelle.....	37
a. Différence de l'évolution de l'infection en fonction de l'âge.....	37
b. Évolution de l'infection.....	38
1. Cas d'une hépatite B aigüe « résolutive ».....	38
2. Évolution de l'hépatite B chronique.....	39
10. Prophylaxie.....	40
11. Traitements.....	41
a. Objectifs : cure fonctionnelle et cure totale.....	41
b. Traitements actuels.....	41
c. Traitements en cours d'étude.....	41
1. Les inhibiteurs d'entrée du virus.....	41
2. Les bloqueurs de la réparation du rcDNA en cccDNA.....	42
3. Les inhibiteurs de l'assemblage de la capsid.....	42
4. Les modulateurs des récepteurs de type Toll (TLR).....	42
5. Les siRNA.....	42
6. Dégradation du cccDNA par l'IFN $\alpha$ et l'agoniste de LT $\beta$ R.....	42

7. Dégradation du cccDNA par CRISPR/CAS9 .....	43
<b>II. VHB et métabolisme des acides biliaires.....</b>	<b>45</b>
1. Structure des acides biliaires .....	45
2. Différence de composition du pool d'acides biliaires entre l'Homme et la souris .....	46
3. Circuit entéro-hépatique .....	46
4. Le farnésoid X receptor $\alpha$ (FXR $\alpha$ ).....	47
a. Généralités .....	47
b. Isoformes de FXR $\alpha$ .....	48
c. Structure de FXR $\alpha$ .....	48
d. Eléments de réponses de FXR $\alpha$ (FXRE).....	49
e. Mécanisme d'action de FXR $\alpha$ .....	49
f. Rôles physiologiques de FXR $\alpha$ .....	51
1. Rôle dans le métabolisme des acides biliaires.....	51
2. Autres rôles de FXR $\alpha$ .....	52
5. Liens entre le métabolisme des AB et la flore intestinale .....	52
6. Les ligands de FXR $\alpha$ .....	53
a. Les ligands naturels et synthétiques de FXR $\alpha$ .....	53
b. Les applications cliniques des agonistes de FXR $\alpha$ .....	54
7. Liens entre le VHB et le métabolisme des acides biliaires.....	54
a. Régulation de la transcription du génome viral par les récepteurs nucléaires.....	54
b. Identification de séquences FXRE sur le génome viral .....	55
c. Compétition entre les acides biliaires et le VHB pour NTCP.....	57
d. Interaction FXR $\alpha$ -HBx-Sirt1 .....	57
e. Conséquences de l'infection par le VHB sur FXR $\alpha$ .....	57
<b>HYPOTHÈSES ET CHOIX DES MODÈLES.....</b>	<b>58</b>
<b>I. Hypothèses .....</b>	<b>59</b>
<b>II. Modèles d'études .....</b>	<b>59</b>
1. Modèles <i>in vitro</i> .....	59
a. Les hépatocytes primaires humains (HPH).....	59
b. Les HepaRG différenciées (dHepaRG).....	60
c. Les lignées hépatocytaires Huh7 et HepG2 .....	60
2. Modèles <i>in vivo</i> .....	61
a. Les souris C3H/HeN transduits par AAV2/8-VHB.....	61
1. Définition d'un AAV .....	61
2. AAV2/8-VHB.....	61
3. Les souris C3H/HeN .....	61
b. Les souris à foie humanisé : un modèle d'étude imparfait pour l'étude de la modulation de la répllication du VHB par FXR $\alpha$ .....	62
<b>TRAVAUX RÉALISÉS.....</b>	<b>64</b>
<b>I. Première étude .....</b>	<b>65</b>
<b>II. Deuxième étude .....</b>	<b>79</b>
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>115</b>
<b>PERSPECTIVES.....</b>	<b>122</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>125</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>127</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>143</b>
Présentations des travaux dans des congrès scientifiques.....	144
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>145</b>

## IV. LISTE DES FIGURES

Figure 1 : L'hépatite B est un problème de santé publique majeur.

Figure 2 : Organisation compacte du génome du VHB.

Figure 3 : Structure du VHB.

Figure 4 : Structure des domaines protéiques du VHB.

Figure 5 : Cycle de vie du VHB.

Figure 6 : Étapes de réparation du rcDNA du VHB en cccDNA.

Figure 7 : Morphologie du cccDNA.

Figure 8 : Régions régulatrices du génome du VHB.

Figure 9 : Production de particules virales défectives et de la protéine HBSP à partir de l'ARNpg épissé.

Figure 10 : Formation de la protéine HBSP à partir de l'épissage alternatif de l'ARNpg.

Figure 11 : Distribution des nucléosomes et des modifications post-traductionnelles d'histones sur le génome du VHB.

Figure 12 : HBx séquestre Cul4-DDB1 pour promouvoir la dégradation du complexe Smc5/6 par le protéasome.

Figure 13 : Étapes de la rétrotranscription de l'ARNpg du VHB en rcDNA.

Figure 14 : Morphologie des particules virales.

Figure 15 : Cinétique des marqueurs d'une hépatite B aiguë résolutive chez l'adulte.

Figure 16 : Phases d'évolution de la chronicité du VHB.

Figure 17 : Structure et métabolisme des acides biliaires.

Figure 18 : Composition relative des acides biliaires chez l'Homme et la souris.

Figure 19 : Circuit entéro-hépatique des acides biliaires.

Figure 20 : Structure des récepteurs nucléaires, exemple de FXR $\alpha$ .

Figure 21 : Mode d'action de FXR $\alpha$ .

Figure 22 : La régulation de la synthèse des AB par la répression de CYP7A1 est médiée par les voies de signalisation de FXR $\alpha$ .

Figure **23** : Impact de la flore intestinale sur le pool d'acides biliaires.

Figure **24** : Identification de deux séquences consensus FXRE dans la région Enhancer 2 - promoteur de Core du génome du VHB.

Figure **25** : Différenciation des HepaRG.

Figure **26** : Régulation non physiologique du pool d'acides biliaires et de la taille du foie chez les souris à foie humanisé.

Figure **27** : Localisation des deux séquences FXRE présents sur le rcDNA du VHB.

Figure **28** : Différente réponse aux agonistes de FXR $\alpha$  dans les lignées hépatocytaires.

## V. LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>6-ECDC</b>	6 $\alpha$ -ethyl-chenodeoxycholic acid
<b>AAV</b>	Adeno-associated virus
<b>AB</b>	Acide biliaire
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AF-1/2</b>	Activation function 1/2
<b>AgHBe</b>	Antigène HBe
<b>AgHBs</b>	Antigène HBs
<b>ALAT</b>	Alanine transaminase
<b>ANRS</b>	Agence nationale de recherche sur le sida et les hépatites virales
<b>APE1</b>	Apurinic/aprimidinic (AP) endonuclease 1
<b>APOA1</b>	Apolipoprotéine A1
<b>AR</b>	Acide rétinoïque
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ASBT</b>	Apical sodium-bile acid transporter
<b>ASHV</b>	Arctic squirrel hepatitis virus
<b>BA</b>	Bile acid
<b>BSEP</b>	Bile Salt Export Pump
<b>CA</b>	Cholic acid
<b>CAS9</b>	CRISPR associated protein 9
<b>CBP</b>	CREB-binding protein
<b>cccDNA</b>	covalently closed circular DNA
<b>CDCA</b>	Chenodeoxycholic acid
<b>ChHBV</b>	Chimpanzee hepatitis B virus



<b>ChIP</b>	Chromatin immunoprecipitation
<b>CREB</b>	cAMP responsive element binding protein
<b>CRISPR</b>	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
<b>Cul4</b>	Cullin 4
<b>CYP7A1</b>	Cholesterol 7 alpha-hydroxylase
<b>CYP8B1</b>	Sterol 12 alpha-hydroxylase
<b>DBD</b>	DNA-binding domain
<b>DDB1</b>	DNA damage-binding protein 1
<b>DHBV</b>	Duck hepatitis B virus
<b>DMSO</b>	Dimethyl sulfoxide
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid
<b>DR</b>	Direct repeat
<b>DRIP</b>	vitamin D receptor interacting protein
<b>Enh I</b>	Enhancer I
<b>Enh II</b>	Enhancer II
<b>FA</b>	Fatty acid (AG : Acide gras)
<b>FGF15/19</b>	Fibroblast growth factor 15/19
<b>FGFR4</b>	Fibroblast growth factor receptor 4
<b>FXR</b>	Farnesoid X receptor
<b>FXRE</b>	FXR response element
<b>GiHBV</b>	Gibbon Hepatitis B virus
<b>GoHBV</b>	Gorilla hepatitis B virus
<b>GSHV</b>	Ground squirrel hepatitis virus
<b>GTHBV</b>	Grey teal hepatitis B virus
<b>HAT</b>	Histone acétyltransférerase

<b>HBC</b>	Hépatite B chronique
<b>HBHBV</b>	Horseshoe bat hepatitis B virus
<b>HBSP</b>	Hepatitis B spliced protein
<b>HDAC</b>	Histone désacétylase
<b>HHBV</b>	Heron hepatitis B virus
<b>HNF4</b>	Hepatocyte nuclear factor 4
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IR</b>	Inverse repeat
<b>LBD</b>	Ligand binding domain
<b>LT<math>\beta</math>R</b>	Lymphotoxin beta receptor
<b>MCA</b>	Muricholic acid
<b>NCoR</b>	Nuclear receptor co-repressor
<b>NLS</b>	Nuclear localization sequence
<b>NR</b>	Nuclear receptor
<b>NRRE</b>	Nuclear receptor response element
<b>nt</b>	nucléotides
<b>NTCP</b>	Na <sup>+</sup> -taurocholate cotransporting polypeptide
<b>NUCs</b>	Nucleotide analogues
<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la santé
<b>ORF</b>	Open reading frame
<b>OST</b>	Organic solute transporter
<b>OuHV</b>	Orang-utan hepadnavirus
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>PEG</b>	Polyéthylène glycol

<b>PGC1<math>\alpha</math></b>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
<b>PPAR</b>	Peroxisome proliferator activated receptor
<b>PTM</b>	Post-translational modification
<b>RBHBV</b>	Roundleaf bat hepatitis B virus
<b>rcDNA</b>	Relaxed circular DNA
<b>RN</b>	Récepteur nucléaire
<b>RNA</b>	Ribonucleic acid
<b>RNAi</b>	RNA interference
<b>RNA pol II</b>	RNA polymérase II
<b>RXR</b>	Retinoid X receptor
<b>SGHBV</b>	Snow goose hepatitis B virus
<b>SHP</b>	Small heterodimer partner
<b>shRNA</b>	short hairpin RNA
<b>SIRT1</b>	Sirtuine 1
<b>Smc</b>	Structural maintenance of chromosomes
<b>SRC-1</b>	Steroid receptor coactivator-1
<b>STHBV</b>	Stork hepatitis B virus
<b>TAF</b>	TATA-binding protein associated factor
<b>TALEN</b>	Transcription activator-like effector nuclease
<b>TBHBV</b>	Tent-making bat hepatitis B virus
<b>TBP</b>	TATA-binding protein
<b>TGR5</b>	Takeda G-protein receptor-5
<b>TH1</b>	Type 1 T helper
<b>TLR</b>	Toll like receptor

<b>TMCA</b>	Tauro-muricholic acid
<b>TP</b>	Terminal protein
<b>TRAP</b>	Thyroid hormone receptor-associated protein
<b>UDCA</b>	Ursodeoxycholic acid
<b>VHB</b>	Virus de l'hépatite B
<b>VIH</b>	Virus de l'immunodéficience humaine
<b>WHV</b>	Woodchuck hepatitis B virus
<b>WMHBV</b>	Woolly monkey hepatitis B virus
<b>ZFP</b>	Zinc finger protein

# INTRODUCTION

*« Si son corps est jaune, son visage jaune, ses yeux jaunes, si ses chairs deviennent flasques : c'est la jaunisse. »*

Inscription traduite de l'akkadien et retrouvée sur une des tablettes cunéiformes découvertes dans les ruines du palais de Ninive construit sous le règne d'Assurbanipal et datant du III<sup>e</sup> millénaire av. J.-C.

# I. Le virus de l'hépatite B

Enfoui dans les ruines du palais d'Assurbanipal, le plus vieux « manuel de médecine » décrivait déjà les symptômes associés à une jaunisse il y a plus de 3000 ans av. J.-C. Depuis, les explications à la jaunisse furent le sujet d'attention des praticiens à chaque époque de l'histoire de la médecine. Ce n'est qu'à partir du XVIII<sup>ème</sup> siècle, avec le développement des techniques médicales comme la vaccination et la transfusion que le concept d'hépatite sérique et celui d'hépatite B vit le jour. En 1966, l'antigène « Australia » fut identifié par Blumberg comme l'agent responsable de l'hépatite B <sup>1</sup>. Par la suite, la morphologie des particules virales du virus de l'hépatite B fut décrite par Dane en 1970 <sup>2</sup>, la structure du génome viral par Summers en 1975 <sup>3</sup> et enfin son séquençage complet fut réalisé par Galibert en 1979 <sup>4</sup>. Voici un chapitre décrivant ce pathogène responsable de la maladie d'hépatite B et sur lequel ma thèse de science a porté.

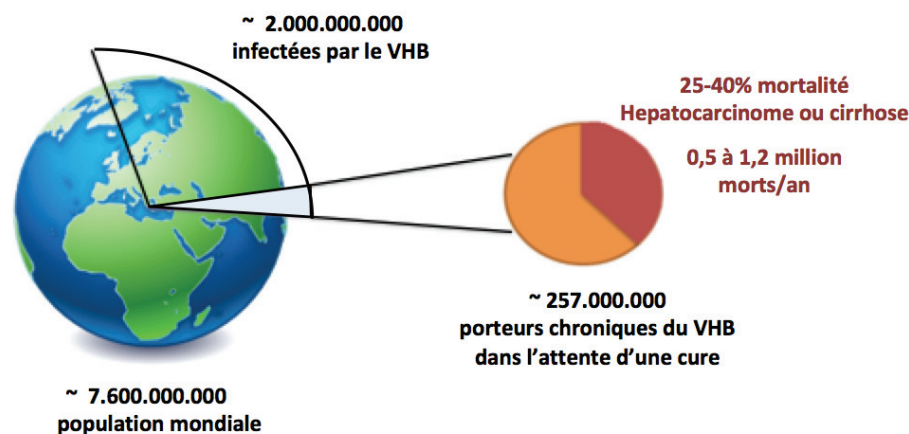
## 1. Classification

Le virus de l'hépatite B est le prototype des *Hepadnaviridae*, une famille de virus regroupant des virus enveloppés à ADN partageant une même organisation du génome, un cycle viral composé d'une étape de transcription inverse, un tropisme hépatique et une spécificité d'hôte très étroite. La famille regroupe deux genres : Les *Orthohepadnaviridae* (virus des mammifères) et les *Avihepadnaviridae* (virus aviaires). Parmi les mammifères infectés par les virus de cette famille, on retrouve la marmotte américaine (WHV) <sup>5</sup>, l'écureuil arctique (ASHV) <sup>6</sup>, l'écureuil fouisseur (GSHV) <sup>7</sup>, le gorille (GoHBV) <sup>8</sup>, le chimpanzé (chHBV) <sup>9</sup>, le gibbon (GiHBV) <sup>10</sup>, l'orang-outan (OuHBV) <sup>11</sup> et plus récemment découvert le singe laineux (WMHBV) <sup>12</sup> et les chauve-souris (RBHBV, HBHBV, TBHBV) <sup>13</sup>. Parmi les oiseaux infectés, on retrouve le canard de Pékin (DHBV) <sup>14</sup>, la sarcelle australasienne (GTHBV), le héron cendré (HHBV) <sup>15</sup>, la cigogne blanche (STHBV) <sup>16</sup>, l'oie des neiges (SGHBV) <sup>17</sup> et la grue royale (CHBV) <sup>18</sup>.

Malgré la variété des *Hepadnaviridae*, il n'en existe pas qui infectent des modèles animaux bien établis tels que les souris et les rats. Cependant, l'étude du WHV chez la marmotte est devenu un modèle préclinique pertinent pour la conception de nouveaux antiviraux directs pour le VHB. L'étude du DHBV a été quant à elle indispensable pour l'étude d'aspects fondamentaux de l'infection et de la réplication des *Hepadnaviridae*.

## 2. Épidémiologie

Le virus de l'hépatite B (VHB) est un agent infectieux ciblant le foie et qui est à l'origine de maladies aiguës ou chroniques. Un communiqué de presse de l'organisation mondiale de la santé (OMS) du 21 avril 2017 indique que deux milliards de personnes ont été infectés par ce virus dont 257 millions atteints de la maladie d'hépatite B chronique qui a causé le décès de 1,34 million de personnes en 2015 suite à une cirrhose ou à un cancer du foie. En 2010, l'hépatite B était classée dixième cause de décès dans le monde atteignant ensuite la septième place en 2013 <sup>19,20</sup> (**Figure 1**). L'hépatite B constitue donc un problème de santé publique majeur <sup>21</sup> qui est d'un grand intérêt tant pour la recherche académique que pharmaceutique.



**Figure 1 : L'hépatite B est un problème de santé publique majeur.** L'OMS estime qu'en 2015, à l'échelle mondiale, que 257 millions de personnes étaient chroniquement infectées par le VHB. Cette même année, 887.000 personnes sont décédées des suites d'une infection par le VHB notamment de cirrhose ou d'hépatocarcinome et 1,75 million nouvelles infections par le VHB sont survenues dans le monde. Adapté de <sup>(21)</sup>.

### 3. Répartition géographique et transmission

Le VHB est distribué dans le monde entier mais certaines régions telles que l'Extrême Orient (115 millions), l'Afrique sub-saharienne (60 millions) et le Moyen Orient (21 millions) se distinguent par le taux élevé de prévalence de l'infection par cet agent. La Chine est le plus gros réservoir de porteurs d'hépatite B chronique dans le monde. La transmission du VHB se fait par contact avec des fluides infectés, le sang étant le principal vecteur de transmission bien que le sperme et la salive soient aussi impliqués. La transmission se produit par une exposition percutanée ou des muqueuses à des fluides infectieux, par contact sexuel ou en périnatal <sup>22</sup>.

Dans les zones de hautes endémies, la transmission est essentiellement verticale de la mère à l'enfant avec un taux de chronicité avoisinant les 90% suivi le plus souvent de retransmission à la génération suivante. À l'opposé dans les régions à faible ou moyenne incidence du VHB la transmission est le plus souvent horizontale avec des infections résolutive dans plus de 90% des cas <sup>23</sup>.

L'hépatite B est considérée comme une maladie infectieuse extrêmement contagieuse puisque le virus est jusqu'à 100 fois plus infectieux, par voie sexuelle, que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) <sup>24</sup>.

L'infection par le VHB est l'un des premiers virus identifiés comme cause de cancer chez l'Homme et l'un des facteurs de risques du carcinome hépatocellulaire (CHC) <sup>25</sup>. Le risque de CHC est jusqu'à 20 fois plus élevé chez les personnes infectées par le VHB que chez les personnes non infectées <sup>26</sup>. L'infection chronique par le VHB et le CHC partagent une distribution géographique similaire puisque la chronicité est impliqué dans la genèse de 85% de cas de CHC dans les zones endémiques comme en Chine et en Afrique sub-saharienne <sup>27</sup>.



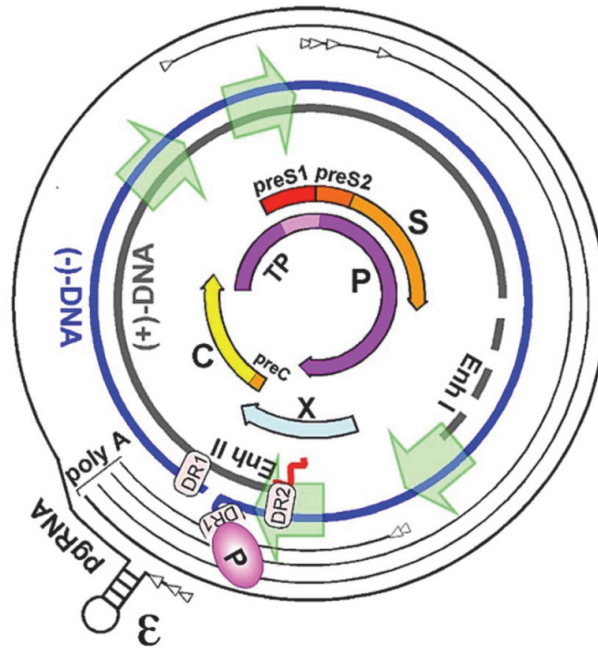
#### 4. Génotypes

L'évolution à long terme du VHB, les mutations de son génome et l'absence d'activité correctrice de sa polymérase virale (proof reading), a entraîné l'apparition de divers génotypes, de sous-types, de mutants et de quasi-espèces.

Il existe à ce jour au moins 10 génotypes (A à J) et plus de 30 sous-types de VHB recensés <sup>28,29</sup>. Les génotypes ont différentes distributions géographiques et sont associés à l'endémicité du VHB, aux modes de transmission ainsi qu'aux résultats cliniques. Le génotype A se retrouve en Afrique, Europe, Inde et Amérique. Les génotypes B et C sont les plus communs en Asie et dans la région Pacifique, notamment en Chine. Le génotype D présente 7 sous-types et il est répandu en Europe, Afrique, Inde, Indonésie, Australie et dans la région méditerranéenne. Les génotypes E à L sont plus limités géographiquement. En effet, le génotype E ne se retrouve qu'en Afrique de l'ouest et central et en Arabie Saoudite. Le génotype F est retrouvé en Amérique centrale et du sud. Le génotype G est retrouvé en France, Allemagne et Mexique. Le génotype H est retrouvé en Amérique centrale et au Mexique. Le génotype I a été isolé dans le Vietnam et le Laos. Enfin, le génotype J a été recensé au Japon <sup>30</sup>.

#### 5. Génome

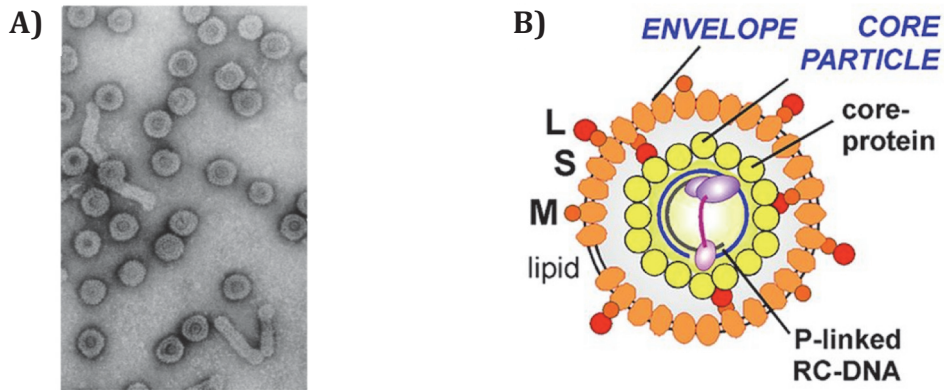
Les caractéristiques les plus remarquables du génome du VHB sont sa petite taille de 3,2 kb <sup>31</sup> et son organisation extrêmement compacte avec chaque nucléotide ayant une fonction codante dans un ou même deux cadres de lectures (ORFs) chevauchants. Le génome viral comporte 4 ORFs (P, preC/C, preS/S et X) avec 6 codons starts (AUG). L'ORF preC/C chevauche partiellement l'ORF P et l'ORF preS/S est localisé dans l'ORF P. Le génome viral comporte un signal de polyadénylation en 3' du gène de core et des signaux en *cis* important pour la réplication de l'ADN. Tous les ARNs viraux sont coiffés en 5' et polyadénylés en 3' se terminant en position 1919 nt. **(Figure 2)**.



**Figure 2 : Organisation compacte du génome du VHB.** Les lignes extérieures (noir clair) représentent les ARN viraux qui sont transcrits à partir de l'ADN circulaire clos de façon covalente et tous polyadénylés en leur bout 3' (poly A). Les pointes de flèches marquent le début de la transcription. Le symbole  $\epsilon$  représente la tige-boucle de l'ARN pré-génomique qui est le signal de son encapsidation. Au centre, les deux brins d'ADN représentent l'ADN relâché et circulaire avec un brin négatif (bleu) et un brin positif incomplet (noir foncé). Une amorce d'ARN (rouge) est présente en 5' du brin d'ADN positif. La polymérase virale P (rose) est fixée en 5' du brin négatif. DR1 et DR2 sont deux séquences de répétitions directes. Les éléments régulateurs sont les régions Enhancer (Enh I, Enh II) et promotrices (flèches vertes). Les 4 ORFs chevauchantes sont représentées par 4 flèches de couleurs distinctes. D'après <sup>(32)</sup>.

## 6. Structure de la particule virale

La structure du VHB fut décrite pour la première fois par l'anglais David Dane en 1970 par microscopie électronique <sup>2</sup> (**Figure 3A**). Il s'agit d'une particule sphérique de 42 nm de diamètre à enveloppe lipidique associée à des protéines de surfaces de différentes tailles, petites (S), moyennes (M), grandes (L) et d'une nucléocapside icosaédrique formée de 120 dimères de protéines de capsides <sup>33</sup> contenant un ADN partiellement double brin de 3,2 kb <sup>3</sup>. Les protéines S se localisent sur l'enveloppe et les protéines M et L se superposent dessus avec une orientation soit vers l'intérieur ou l'extérieur du virion <sup>34</sup>. La capside comporte le génome viral qui est un ADN circulaire partiellement double-brin (relaxed circular DNA, rcDNA) dans lequel le bout 5' du brin négatif est lié de façon covalente à la polymérase virale (P) <sup>35</sup> (**Figure 3B**).

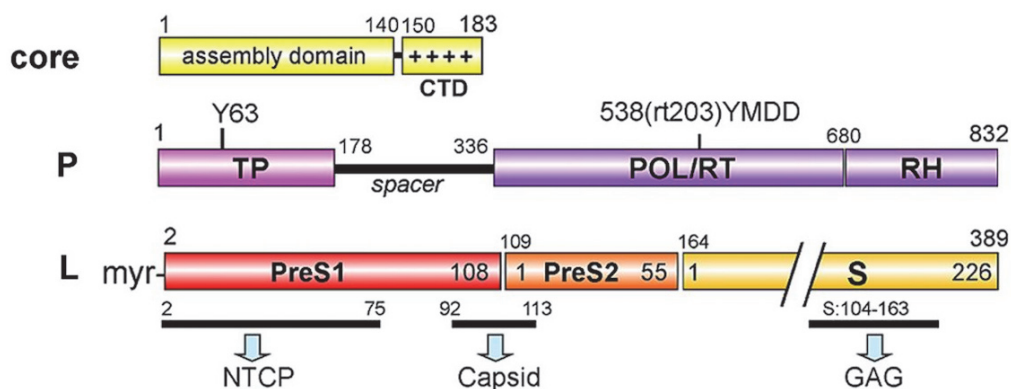


**Figure 3 : Structure du VHB.** A) Image de microscopie électronique en coloration négative, de particules de Dane de sérum de patient chroniquement infecté par le VHB ; D'après (2). B) Schéma de la structure d'un virion d'hépatite B ; D'après (32).

## 7. Protéines virales constituant la particule de Dane

La protéine de capsid C comporte un domaine d'assemblage (1-140) et un domaine C-terminal, CTD, riche en Arginine (150-183) phosphorylable et jouant un rôle dans l'acheminement de la capsid vers le noyau (**Figure 4**).

La polymérase P, aux multiples fonctions, est composée de 4 domaines distincts : Un domaine TP (protéine terminale), un « spacer » qui n'a aucune fonction enzymatique, un domaine POL/RT ayant une activité polymérase et reverse transcriptase et responsable de la synthèse du génome viral et un dernier domaine RH qui code pour la RNase H<sup>36</sup>. Les domaines des protéines de surface preS1, preS2 et S ont différentes fonctions en rapport avec leur topologie transmembranaire. La partie intérieure de preS1 qui chevauche en partie avec le domaine preS2 interagit avec les particules de capsides pour la formation de l'enveloppe (preS1 92-108, preS2 109-113)<sup>37</sup>. Les trois glycoprotéines possèdent différents domaines N-terminaux car elles utilisent trois codons start AUG<sup>38</sup>.

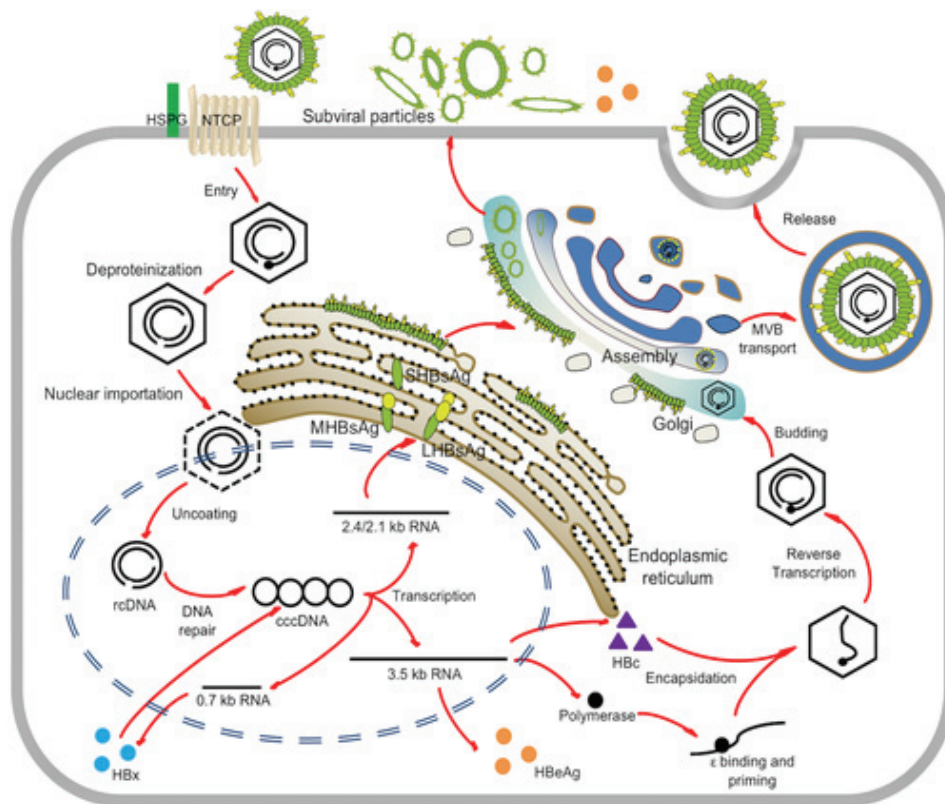


**Figure 4 : Structure des domaines protéiques du VHB.** Les nombres représentent la position des acides aminés (GenBank U95551.1 génotype D, sous-type ayw<sup>39</sup>). TP, protéine terminale ; POL/RT, ADN polymérase / reverse transcriptase ; RH, RNase H ; L, protéine de surface de grande taille comprenant les domaines preS1, preS2 et S. La protéine de surface de taille moyenne M se compose du domaine preS2 et S; myr, myristoyl; NTCP, sodium traurocholate cotransporting polypeptide ; GAG, les glycosaminoglycanes. D'après (32).

## 8. Cycle viral

### a. Entrée du virus

Le VHB a un tropisme pour les hépatocytes et son entrée est un processus à plusieurs étapes (**Figure 5**). D'abord, les virions de l'hépatite B se concentrent sur les hépatocytes à travers une première interaction de la région exposée du domaine S du VHB (104-163) et les héparanes sulfate protéoglycanes (HSPG) de la surface cellulaire <sup>40</sup> (**Figure 4 et 5**). Lors des expériences d'infections *in vitro*, l'ajout de 4% de polyéthylène glycol (PEG) est nécessaire pour augmenter cette interaction <sup>41</sup> qui est un prérequis indispensable mais pas suffisant pour l'entrée du virus <sup>42</sup>. Ensuite, cette faible interaction est renforcée par une seconde fixation au sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) identifié en 2012 comme un récepteur fonctionnel de l'hépatite B et D <sup>43</sup>.



**Figure 5 : Cycle de vie du VHB.** Le VHB se fixe à son récepteur d'entrée NTCP sur les hépatocytes et libère sa capsid dans le cytoplasme qui migre vers le noyau puis libère son génome à ADN partiellement double brin (rcDNA). Cet ADN est ensuite réparé en une forme circulaire clos de façon covalente (cccDNA) qui sera la base de transcription des ARN viraux. L'ARN pré-génomique est ensuite rétrotranscrit dans de nouvelles capsides qui acquièrent les protéines d'enveloppes en traversant le complexe appareil de Golgi et réticulum endoplasmique. De nouveaux virions infectieux sont ainsi formés et sécrétés pour infecter de nouveaux hépatocytes. Des particules non infectieuses AgHBs et AgHBe sont également sécrétées. D'après <sup>(44)</sup>.

## b. Migration de la capsid au noyau

Le virus est probablement internalisé par endocytose, par un mécanisme encore peu clarifié. Une étude a montré que l'entrée du virus était dépendante de la caveolin-1<sup>45</sup> mais récemment une autre étude a montré que la clathrine était nécessaire pour l'entrée du VHB<sup>46</sup>. À la suite de son internalisation, il est supposé que la capsid du VHB se désintègre avant l'entrée du génome dans le noyau. Le mécanisme de cette étape importante n'est pas clair mais il a été montré que les petites GTPases, Rab5 et Rab7, étaient impliquées<sup>47</sup>. En effet, les protéines Rab agissent comme des molécules régulatrices dans la formation, le transport, l'attachement et la fusion de vésicules pour réguler le trafic entre les organelles. Il est probable que la maturation des endosomes soit nécessaire pour l'entrée du virus dans le noyau mais le mécanisme par lequel le VHB échappe à la dégradation du lysosome pour transporter son génome encore encapsidé au noyau est peu connu.

L'acheminement de la nucléocapsid au noyau a lieu en 15 minutes via le réseau de microtubules<sup>48</sup>. L'exposition du signal de localisation nucléaire (NLS) du domaine C-terminal riche en Arginine (CTD) de la protéine Core<sup>49</sup>, probablement régulé par la phosphorylation du CTD<sup>48,50</sup> et/ou par la synthèse complète du brin positif d'ADN du rcDNA, permet le transport de la nucléocapsid au pore nucléaire là où la capsid se désintègre<sup>51</sup> et relâche le rcDNA dans le nucléoplasme.

Seules les capsides avec un génome mature sont déphosphorylées, les rendant moins stables, prêtes à être désassemblées pour libérer leur contenu de rcDNA dans le noyau, à travers une interaction avec la nucleoporine 153 (Nup153) du complexe des pores nucléaires (NPC)<sup>51,52</sup>.

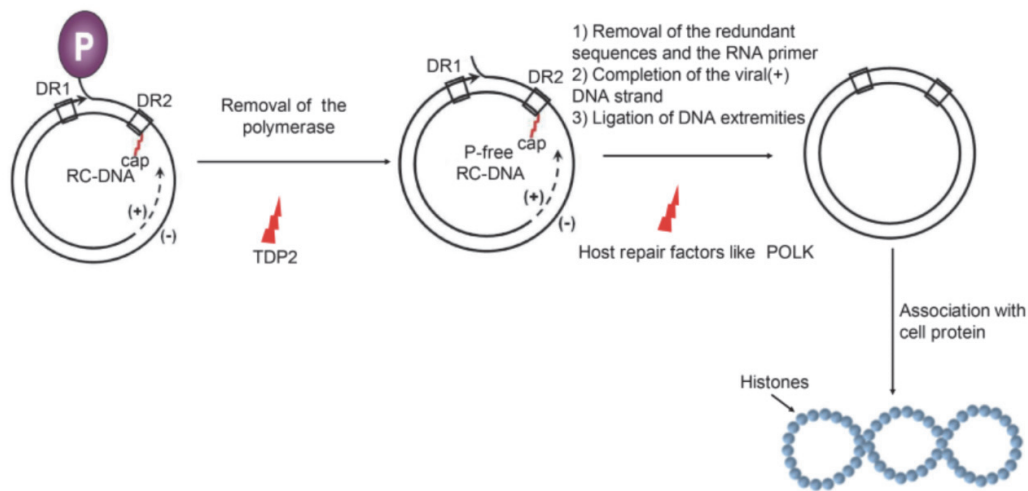
## c. Réparation du rcDNA en cccDNA

Une fois dans le noyau, le rcDNA subit plusieurs étapes de réparation d'ADN par le système de réparation cellulaire pour donner naissance au cccDNA (covalently closed circular DNA) qui est une forme d'ADN circulaire clos de façon covalente, stable et difficile à dégrader et qui joue un rôle clef dans la persistance et la récurrence du VHB<sup>53</sup> (**Figure 6**). Le mécanisme de réparation du rcDNA en cccDNA est à ce jour très peu compris. Trois étapes principales résument ce processus de réparation. D'abord, la polymérase P liée de façon covalente en 5' du brin d'ADN négatif (-) est retirée donnant une forme de rcDNA intermédiaire sans protéines<sup>54,55</sup>. Ensuite, il y a élimination de l'amorce d'ARN en 5' du brin positif (+) et du bout redondant en 5' du brin (-) et synthèse de la partie incomplète du brin (+). Enfin, la dernière étape consiste en la ligation des deux brins (+) et (-) et l'association de protéines cellulaires et virales pour former le cccDNA.

Plusieurs facteurs cellulaires de l'hôte sont impliqués dans ce mécanisme de réparation. Une étude récente *in vitro* a montré que la tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2 (TDP2) cellulaire pourrait être impliquée dans le décrochage de la polymérase virale liée de façon covalente au 5' du brin (-)<sup>56</sup>. Cependant, l'extinction du gène *Tdp2* ne bloque pas la formation du cccDNA pendant l'infection par le VHB de cellules hépatocytaires susceptibles à l'infection et n'empêche pas l'amplification du cccDNA du DHBV<sup>57</sup>.

Une autre étude a montré que l'ADN polymérase  $\kappa$  (POLK) est un facteur cellulaire crucial et nécessaire pour la formation du cccDNA<sup>58</sup>. Il s'agit d'une polymérase jouant un rôle fonctionnel dans la voie de réparation par excision de nucléotides ou NER (nucleotide excision repair) en remplaçant les nucléotides endommagés après leur excision<sup>59</sup> et ayant une forte activité dans les cellules qui se divisent peu ou pas.



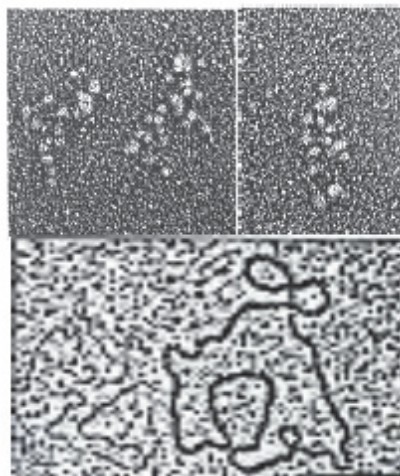


**Figure 6 : Étapes de réparation du rcDNA du VHB en cccDNA.** Les facteurs cellulaires impliqués dans les différentes étapes de réparation sont mal connus. Les protéines TDP2 et POLK pourraient jouer un rôle important dans ce mécanisme (éclair rouge). P, polymérase virale ; TDP2, Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2 ; POLK, DNA polymerase kappa. D'après <sup>(60)</sup>.

#### d. Établissement du cccDNA

##### 1. Structure du cccDNA

Le cccDNA du VHB a été observé dans le noyau des cellules infectées, par microscopie électronique en 1994 et décrit comme étant un ADN à apparence de « perles sur un collier » formant une structure similaire à la chromatine de l'hôte « minichromosome » et organisé en nucléosome où des associations aux protéines virales HBx et HBc ont lieu <sup>61</sup> (**Figure 7**).



**Figure 7 : Morphologie du cccDNA.** Image de microscopie électronique du cccDNA isolé du noyau de lignée d'hépatoblastome HepG2.2.15 mettant en avant sa structure de « perles sur un collier ». D'après <sup>(61)</sup>.

Le cccDNA a d'abord été détecté par Southern blot dans le foie infecté de canards <sup>62,63</sup>, du spermophile de Californie <sup>64</sup> et d'humains <sup>65</sup> et qualifié d'ADN viral exclusivement nucléaire et non associés à des particules virales. La détection par Southern blot apporte une distinction unique du cccDNA par rapport aux autres formes du génome du VHB (rcDNA ; dsLDNA, ADN double brin et ssDNA, ADN simple brin) <sup>32</sup>. En effet, Le cccDNA est un ADN double-brin super-enroulé qui exerce une mobilité électrophorétique plus importante que sa forme linéaire de la même taille ou circulaire qu'est le rcDNA.

## 2. Régulation du cccDNA

### a. Régions régulatrices et transcription

Le génome viral comporte 4 régions promotrices : La région promotrice preS1 (pS1), preS2 (pS2), Core (pC) et X (pX) ainsi que deux régions Enhancer (Enh1 et Enh2) localisées en amont de la région pC (**Figure 8**).

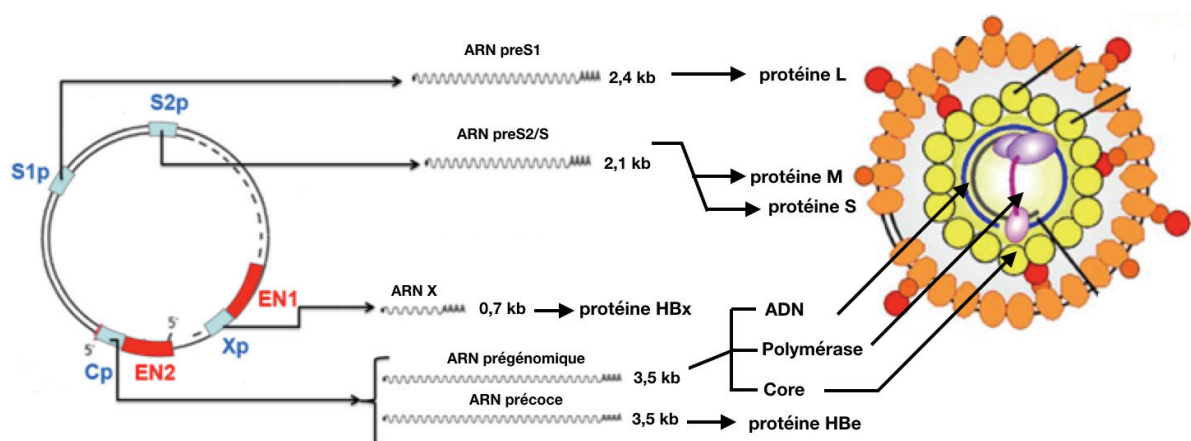
pS1 contrôle la synthèse de l'ARNm preS1 de 2,4 kb qui code la grande protéine de surface L (39 kDa). pS2 contrôle la synthèse de l'ARNm preS2/S de 2,1 kb qui code la moyenne protéine de surface M (30 kDa) et la petite S (24 kDa).

pC gouverne de façon distincte la synthèse de l'ARN prégénomique (ARNpg) et l'ARN précocore (ARNprec) d'environ 3,5 kb. La distance entre les deux sites d'initiation de la transcription de l'ARNpreC et de l'ARNpg est d'environ 35 nucléotides. L'ARNpg code pour la polymérase (90 kDa), la protéine core (21 kDa) et sert de base de la rétrotranscription en ADN viral dans les nucléocapsides néoformées. L'ARNpreC code pour la protéine précocore (25 kDa) qui subira une étape de maturation par un clivage en N et C terminal lors du déplacement vers les voies sécrétrices pour donner l'AgHBe (17 kDa).

Enfin, pX contrôle la synthèse de l'ARNm X qui code la protéine HBx (17 kDa).

La région Enh1 se trouve en amont de pX et module son activité ainsi que celle de pC et dans une moindre mesure celle de pS1 et pS2.

La région Enh2 se situe en amont de pC et module principalement son activité mais peut aussi contrôler l'activité des 3 autres régions promotrices.



**Figure 8 : Régions régulatrices du génome du VHB.** Quatre régions promotrices (bleu) et deux régions Enhancers (rouge) régulent la transcription du génome du VHB.

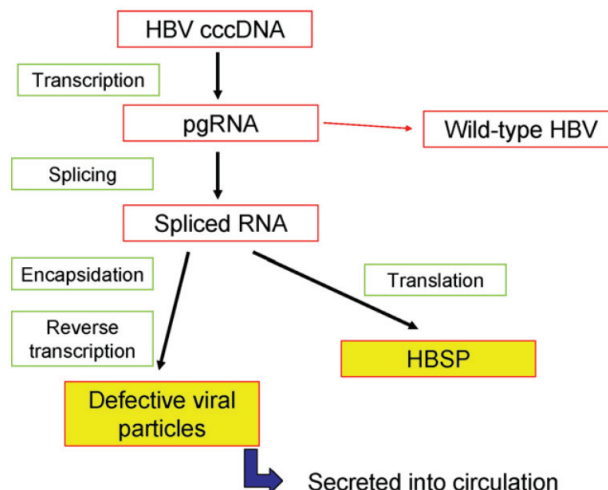
Les régions régulatrices du cccDNA contiennent des sites de fixation de plusieurs facteurs de transcription dont des récepteurs nucléaires. La majorité des facteurs se liant à l'ADN incluent des protéines nucléaires ubiquitaires (CREB, NF1, SP1, AP-1, Prox1) ou des protéines nucléaires enrichies/restrictes au foie (HNF1, HNF3, HNF4 $\alpha$ , PPAR $\alpha$ /RXR $\alpha$ , C/EBP, FXR $\alpha$ , COUP-TF, LRH-1, TR2-4) <sup>66</sup> contribuant ainsi au tropisme hépatique du virus <sup>67</sup>.

## b. L'épissage alternatif des ARN du VHB

Malgré la petite taille du génome du VHB, des possibilités complexes de son expression existent. Outre les transcrits du VHB cités ci-dessus, d'autres ARN du VHB résultant d'épissages alternatifs ont été mis en évidence *in vitro* dans des lignées d'hépatocarcinome <sup>68,69</sup> et *in vivo* dans le foie de patients chroniquement infectés <sup>70</sup>. L'épissage alternatif touche l'ARNpg, l'ARN preS1 et l'ARN preS2/S conduisant à la production supplémentaire de sept variants d'ARNpg et de deux variants d'ARN preS2/S <sup>71,72</sup>.

### 1. L'épissage alternatif de l'ARNpg

L'épissage alternatif de l'ARNpg conduit à de nombreux transcrits pouvant représenter jusqu'à 30% des ARNpg totaux <sup>73,74</sup>. Il a été identifié pour la première fois un ARNpg simplement épissé de 2,2 kb (soit 2/3 de la taille de l'ARNpg) dans des cellules d'hépatocarcinome transfectées avec le génome du VHB <sup>68</sup>. Cet ARN n'est pas essentiel à la réplication virale mais peut soit être rétro-transcrit dans la capsidite et former des particules défectueuses soit coder une protéine non structurale de 10,4 kDa nommée HBSP (Hepatitis B spliced protein) <sup>75,76</sup> (**Figure 9**). Les particules virales défectueuses sont retrouvées *in vitro* et dans le sérum de patients atteints d'hépatites B aiguës et chroniques <sup>70,77</sup> et sont maintenues dans la population virale à travers la transcomplémentation avec des virus sauvages dits « helper ».

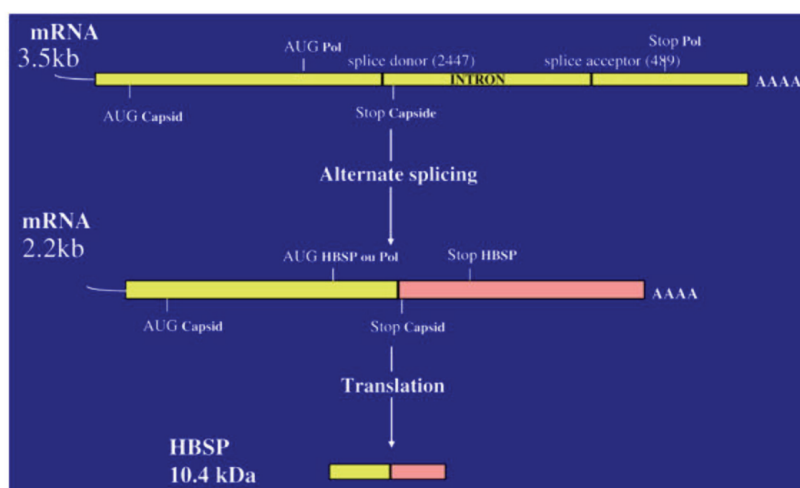


**Figure 9 : Production de particules virales défectives et de la protéine HBSP à partir de l'ARNpg épissé. D'après (78).**



## 2. La protéine HBSP

La traduction de HBSP débute à partir du codon d'initiation de la polymérase virale (AUG) et se poursuit en aval du site d'épissage accepteur. Ainsi la protéine néoformée de 93 acides aminés correspond à la fusion des 46 premiers acides aminés du domaine N-terminal de la polymérase virale et d'un domaine C-terminal de 47 acides aminés composant une séquence nouvelle et différente de toutes les autres protéines du VHB générée par un nouveau cadre de lecture <sup>75</sup> (**Figure 10**).



**Figure 10 : Formation de la protéine HBSP à partir de l'épissage alternatif de l'ARNpg.** L'ARNpg de 3,5 kb du VHB subit un simple épissage alternatif qui donne naissance à un nouvel ARN de 2,2 kb. Cet ARN sert de matrice pour l'expression de la protéine HBSP. Le site d'initiation de la traduction (AUG) de la protéine HBSP est le même que celui de la polymérase virale et la séquence N-terminale de cette nouvelle protéine est identique à celle de la polymérase. Sa séquence C-terminale est différente du fait de l'épissage alternatif générant un nouveau cadre de lecture. Le rectangle jaune correspond au cadre de lecture initial et le rectangle rose à celui créé par l'épissage alternatif. D'après (<sup>79</sup>).

Il est suggéré que HBSP joue un rôle dans l'histoire naturelle de l'infection du VHB et puisse être directement impliquée dans la pathogenèse du foie causée par l'infection au VHB. En effet, la protéine HBSP a été retrouvée dans des biopsies de foie provenant de patients chroniquement infectés par le VHB et ayant un fort niveau de répllication. La présence concomitante d'anticorps anti-HBSP a également été trouvée dans 46% d'échantillons de sérum provenant de 125 porteurs chroniques du VHB. La présence d'anticorps anti-HBSP est associée à la répllication virale, à la sévérité de la fibrose et à la sécrétion élevée de TNF $\alpha$ . HBSP serait associé à un risque accru de développement du carcinome hépatocellulaire <sup>80</sup> ou d'une fibrose <sup>76</sup>. La surexpression de HBSP *in vitro*, induit une apoptose massive par une voie indépendante du cycle cellulaire. Il est possible que HBSP contribue au contrôle de la viabilité des hépatocytes infectés par son action apoptotique et qu'elle soit impliquée dans la persistance de l'infection virale. HBSP module la voie du TNF $\alpha$  <sup>75,76</sup> et active les réponses aux cellules T chez les patients infectés suggérant le rôle potentiel de cette protéine dans la progression de la pathologie du foie <sup>81</sup>.

La mesure de l'ADN résultant de l'épissage alternatif de l'ARNpg du VHB pourrait être utilisée en complément lors du diagnostic pour l'identification de patients chroniquement infectés ayant un fort risque de développer un hépatocarcinome <sup>80</sup>.

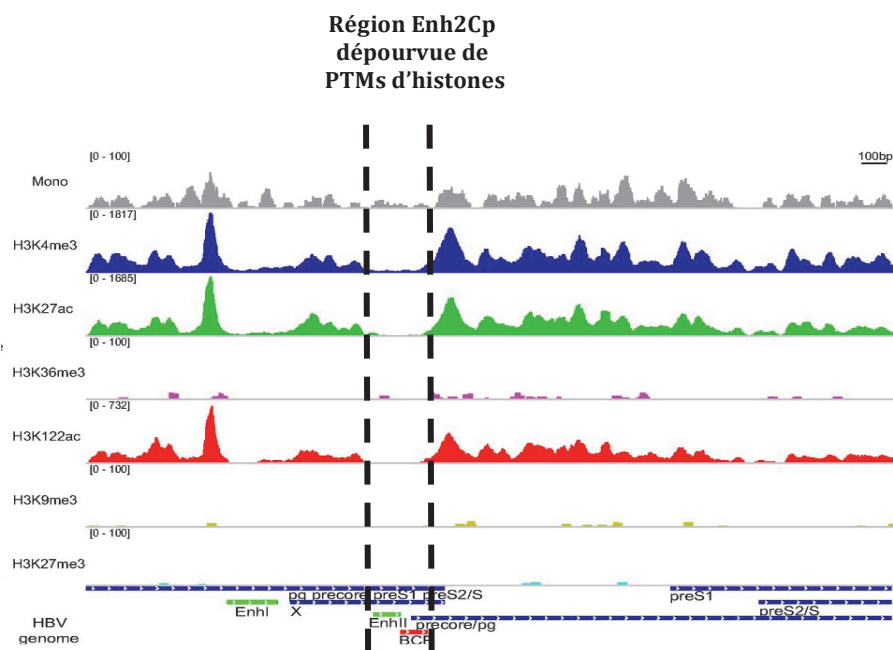
### c. Facteurs impliqués dans la régulation du cccDNA

#### 1. Régulation épigénétique

Le terme épigénétique fait référence aux altérations non héréditaires de l'expression du gène qui se produisent sur le chromosome sans modification de la séquence d'ADN <sup>82</sup>. La thérapie épigénétique est une nouvelle stratégie ciblant les modifications épigénétiques qui a pour la première fois été appliquée avec succès en 2005 dans les traitements contre la leucémie <sup>83</sup>. L'épigénétique est responsable de l'activité ou de la répression du cccDNA et pourrait être ainsi une approche intéressante pour traiter l'hépatite B chronique ou même la guérir.

Comme pour l'ADN cellulaire, un contrôle épigénétique du minichromosome cccDNA a lieu et joue un rôle important dans la régulation de sa transcription. Cela implique des modifications de méthylation de l'ADN, des modifications post-traductionnelles (PTMs) d'histones (acétylation, méthylation, phosphorylation et autres <sup>84</sup>), l'espacement des nucléosomes et probablement des mécanismes plus récemment découverts agissant à travers des ARNs non codants <sup>85</sup> ou le remplacement d'histones par des variants spécifiques <sup>86</sup>.

Dans la chromatine humaine les PTMs des histones apparaissent dans des régions spécifiques comme dans les régions promotrices ou enhancer <sup>87</sup>. Une étude s'est intéressée à répertorier la distribution des PTMs d'histones sur les régions régulatrices du génome du VHB à partir de cellules HepG2 infectées <sup>88</sup> (**Figure 11**). De manière intéressante, la région Enhancer 2 - promoteur de Core (Enh2Cp) est dépourvue de nucléosomes et de PTMs d'histones pouvant éventuellement permettre la fixation de facteurs de transcription. En aval de cette région apparaît un pic de PTMs d'histones (H3K4me3, H3K24ac et H3K122ac).



**Figure 11 : Distribution des nucléosomes et des modifications post-traductionnelles d'histones sur le génome du VHB.** Sur l'axe des ordonnées, la hauteur des pics représente le niveau de densité de chaque piste. Sur l'axe des abscisses figurent les transcrits d'ADN (traits bleus), les régions Enhancer (traits verts) et promoteur de Core (trait rouge). La région Enh2Cp est dépourvue d'histones gardant cette région accessible à des facteurs de transcription. D'après <sup>(88)</sup>.

De manière similaire, la cartographie de la distribution des nucléosomes sur le cccDNA du DHBV dans le foie des canards infectés a montré que les nucléosomes n'étaient pas distribués de manière aléatoire. Plusieurs nucléosomes ont été identifiés sur la région (2000-2700 nt) du DHBV, connus pour contenir plusieurs éléments en *cis* de régulation de la transcription <sup>88</sup>.

En clinique, dans le foie de patients infectés, l'activité de réplication du VHB est corrélée avec le statut d'acétylation des histones H3 et H4 fixés sur le cccDNA <sup>89</sup>.

Des inhibiteurs des histones désacétylases (HDAC) inhibent fortement la transcription du cccDNA du DHBV et du VHB et le traitement à l'IFN $\alpha$  empêche la transcription du cccDNA du DHBV en diminuant l'acétylation de l'histone 3 sur la lysine 9 (H3K9) et sur la lysine 27 (H3K27) fixés sur le cccDNA <sup>90</sup>. De plus, le cccDNA contient trois îlots CpG majeurs qui peuvent potentiellement être méthylés <sup>91</sup>. Des degrés différents de méthylation de ces îlots sont présents sur le cccDNA de patients chroniquement infectés par le VHB et de faibles charges virales sont associées à des niveaux élevés de méthylation du cccDNA <sup>92</sup>.

## 2. Régulation par les facteurs métaboliques

Le statut métabolique de l'hôte semble moduler les répliquions du VHB à un tel degré que le virus a été défini comme « métabolovirus ». Plusieurs facteurs cellulaires qui contrôlent la transcription des ARN viraux à partir du génome viral ne sont autres que des régulateurs clés du métabolisme de l'hôte qui détectent et répondent à la transition de l'état de jeûne à celui d'alimentation <sup>93,94</sup>.

Dans un modèle de souris d'infection au VHB par injection hydrodynamique du plasmide contenant une copie du génome viral d'une taille 1,3 fois plus longue (1.3xVHB), le jeûne augmente la réplication du VHB à travers l'activation de HNF4 $\alpha$  par PGC1 $\alpha$  qui est un co-activateur clef de la réponse aux stimuli métaboliques <sup>93</sup>.

### 3. Régulation par la protéine virale HBx

HBx est une protéine de 17 kDa, très conservée chez les *Orthohepadnaviridae* <sup>95,96</sup> et qui est essentielle pour la réplication du virus comme l'ont montré des études *in vitro* dans des hépatocytes primaires <sup>97</sup> et *in vivo* dans des souris à foie humanisé <sup>98</sup>.

En l'absence de HBx, le cccDNA bascule dans un état dit « silencieux » ou « éteint ». HBx est recruté sur le cccDNA et favorise un état de transcription « active » <sup>97</sup> corrélée à la présence d'histones avec les PTMs associées à une transcription active <sup>99,100</sup>. Des études ont montré que l'infection d'hépatocytes primaires humaines (HPH) ou de cellules HepaRG différenciées (dHepaRG) avec des virions contenant un génome muté ne permettant pas l'expression de HBx (VHB $\Delta$ HBx) conduit à la formation des mêmes quantités de cccDNA que dans les cellules infectées par le VHB sauvage. Cependant, l'étape de transcription du cccDNA est affectée par l'absence de HBx puisque l'expression des ARN du VHB n'était détectable que dans les cellules infectées par le virion sauvage <sup>97,101</sup>. Dans les cellules infectées par le VHB $\Delta$ HBx, la complémentation de HBx, même plusieurs semaines post-infection, suffit pour déclencher la transcription du cccDNA <sup>97</sup>.

Par ailleurs, la protéine HBx semble jouer un rôle important dans le processus de carcinogenèse à travers ses propriétés à promouvoir la progression du cycle cellulaire <sup>102</sup> et à inhiber l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs dont p53 <sup>103</sup>. De plus, une forme tronquée de la protéine HBx au niveau C-terminal accélère le développement de la carcinogenèse hépatique induite par la diéthylnitrosamine <sup>104</sup>.

### 4. Régulation par HBx-DDB1

HBx se fixe à plus de 100 protéines cellulaires <sup>105</sup> et notamment avec la protéine de fixation aux dommages spécifiques de l'ADN (DDB1). Il s'agit d'une protéine multifonctionnelle de 125 kDa qui forme un complexe avec DDB2 et reconnaît les lésions de l'ADN induites par les rayons UV dans la voie de réparation NER <sup>106</sup>.

La structure du complexe DDB1 avec le fragment de peptide central de HBx a été résolue <sup>107</sup>. Les résidus 88-100 de HBx forment un motif conservé d'hélices alpha appelé Box H. Cette box est la région minimale nécessaire pour la fixation de HBx à DDB1. Plusieurs mutations dans la box H réduisent la fixation des deux protéines <sup>108</sup>. Des expériences ont montré que les résidus 43-154 de HBx étaient essentiels pour la réplication alors que les résidus 1-42 ne l'étaient pas <sup>109</sup>. Des points de mutations ou des insertions de résidus localisés en dehors de la box H, en position 58, 61, 68, 69, 119, 129 et 139 inhibent la fixation de HBx à DDB1 <sup>95,109</sup>. Ces expériences de mutagenèse ont ainsi montré que la box H et sa région C-terminale sont nécessaires à la fonction de HBx et que les résidus en dehors de cette box influent aussi sur la fixation à DDB1. De plus, des mutations sur HBx empêchant son interaction avec DDB1 inhibent l'infection par le VHB <sup>110</sup>.

DDB1 se fixe aussi à Cullin 4 (Cul 4) pour former un complexe avec l'ubiquitine ligase E3 <sup>111</sup>. Plusieurs virus prennent en otage le complexe DDB1-E3 ubiquitine ligase pour promouvoir la dégradation des protéines cellulaires qui limitent la réplication virale. Par exemple, la protéine V du paramyxovirus SV5 redirige le complexe DDB1-E3

ubiquitine ligase vers la dégradation de Stat1 pour empêcher la signalisation de l'interféron <sup>112</sup>. La protéine Vpx du VIH utilise le complexe ubiquitine ligase DDB1-E3 pour déclencher la dégradation du facteur antiviral SAMHD1 <sup>113</sup>. Il a alors été émis comme hypothèse, que la fixation de HBx à DDB1 permettrait la dégradation par le protéasome d'un facteur de restriction cellulaire spécifique <sup>114,115</sup>.

## 5. Régulation par le complexe Smc5/6

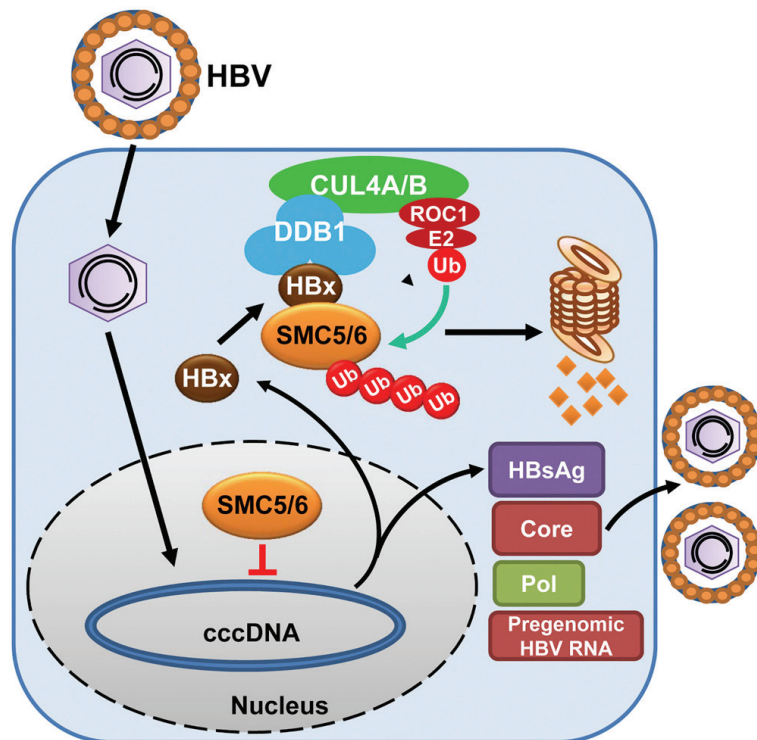
HBx est connu pour activer la transcription d'un grand nombre de gènes codés par un ADN épisomal indépendant des chromosomes cellulaires <sup>116,117</sup>. En effet, HBx module la transcription, indépendamment des séquences promotrices ou Enhancer et agit ainsi en activateur non spécifique de la transcription ou en transactivateur d'ADN épisomal. Cependant, HBx ne transactive pas les gènes chromatinien <sup>114,116</sup>. La transactivation de l'ADN épisomal par HBx nécessite une interaction entre HBx et la machinerie ubiquitine ligase DDB1-Cul 4 <sup>116</sup>.

Les protéines Smc sont des protéines de maintenance structurelle des chromosomes, qui se lient directement à l'ADN et qui sont requises dans la dynamique et la stabilité des chromosomes au cours du cycle cellulaire <sup>118,119</sup>. Des études ont montré que Smc5/6 se fixe et modifie la topologie de l'ADN plasmidique d'une manière ATP-dépendante <sup>120</sup>.

Une étude récente a identifié le complexe Smc5/6 comme cible de HBx pour dégradation par le protéasome <sup>114</sup>. Les auteurs ont exprimé dans une lignée d'hépatocarcinome humain, HepG2, une construction HBx-DDB1 wild type (wt) et une autre mutée ne pouvant se lier à Cul4. HBx-DDB1 wt a permis de co-immunoprécipiter Cul4 et les composants de la E3 ubiquitine ligase alors que le mutant HBx-DDB1 a permis de co-immunoprécipiter les sous-unités du complexe Smc5/6 (Smc5, Smc6, Nse1, Nse2, Nse3 et Nse4). De plus, le niveau d'expression de Smc6 était plus faible dans des cellules exprimant HBx et dans des hépatocytes humains infectés par le VHB *in vitro* et *in vivo*.

Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont montré que la sous-unité Nse4 et probablement le complexe Smc5/6 en entier, se fixe directement sur le cccDNA afin de réprimer sa transcription en absence d'un HBx fonctionnel. En cas de présence d'un HBx fonctionnel, Smc5 et Smc6 sont directement poly-ubiquitinylés par le complexe Cul4-DDB1-HBx-E3 ligase et dégradé par le protéasome et la transcription du cccDNA a lieu (**Figure 12**). La reconnaissance des épisomes par Smc5/6 n'est pas un phénomène séquence dépendant <sup>114,116</sup> et le mécanisme utilisé par ce complexe pour détecter les épisomes et bloquer leur transcription n'est pas encore connu. Cette étude a par la suite été confirmée par une autre équipe, utilisant une méthode différente <sup>115</sup>. Il a été déterminé que Smc5 et Smc6 sont ciblés par HBx mais que le complexe de maintenance relié (cohésine et condensine) ne l'est pas.





**Figure 12 : HBx séquestre Cul4-DDB1 pour promouvoir la dégradation du complexe Smc5/6 par le protéasome. D'après <sup>(121)</sup>.**

### 3. Taille du pool du cccDNA

Le cccDNA est synthétisé à partir du génome viral des virions infectieux ou du recyclage de la nucléocapside. Le nombre de copies de cccDNA varie entre chaque hépatocyte et fluctue sous différentes conditions pathologiques. Des études sur le modèle de la marmotte infectée par le WHV montrent que le pool de cccDNA dans les hépatocytes varie entre 1 à 50 copies par cellule <sup>122,123</sup>. Dans le modèle de canard infecté par le DHBV, une étude a montré que le nombre de copies de cccDNA diffère de manière significative d'une cellule à une autre et cela à différents temps post-infection. Dans 90% des hépatocytes il y a 1 à 17 copies de cccDNA et plus dans les 10% restants <sup>124</sup>. Enfin, des études cliniques ont montré que le niveau médian de cccDNA intrahépatique chez les patients chroniquement atteints d'hépatite B est d'environ 1 copie par cellule, variant de 0,035 à 195 copies par cellule <sup>125,126</sup>.

Des études chez les marmottes et les canards chroniquement infectés par le VHB ont montré que la demi-vie du cccDNA varie entre 33 et 57 jours <sup>127,128</sup> et des valeurs similaires ont été obtenues dans des hépatocytes primaires <sup>129</sup>. Durant la phase de clairance d'infection aiguë chez le chimpanzé, la demi-vie du cccDNA est réduite à 3 jours environ <sup>130</sup> bien que des traces de cccDNA persistent pendant des années.

### 4. Persistance du cccDNA

Des études sur le modèle DHBV ainsi que sur la marmotte ont établi le rôle crucial du cccDNA dans le cycle de réplication et comme étant la forme de latence du VHB. La maintenance de la stabilité et du fonctionnement du cccDNA permet au virus de persister pendant des décennies sachant qu'une cinétique avec des chiffres fiables de perte du cccDNA chez des patients humains est difficile à obtenir.

Le rebond de la réplication virale chez des personnes en immunodépression ayant été infectées dans le passé sans développer d'hépatite B chronique ou bien chez les patients chroniquement infectés ayant arrêté les analogues nucléotidiques met en exergue la longévité de cette forme d'ADN <sup>131</sup>.

Contrairement à d'autres virus à ADN comme les polyomavirus, les papillomavirus et les *Herpesviridae*, tous établissant des épisomes nucléaires d'ADN circulaire capables de se répliquer de manière semi-conservative dans le noyau des cellules hôtes, le cccDNA du VHB ne peut se répliquer tout seul et ne peut être formé qu'à partir du rcDNA qui provient de la capsid cytoplasmique <sup>132</sup>.

Le VHB est un virus peu ou pas cytopathique et les cellules infectées par le VHB continuent à se diviser et à croître <sup>133</sup>. Les hépatocytes se divisent en moyenne deux fois par an dans un foie normal <sup>134,135</sup> et le niveau de prolifération est fortement augmenté au cours de l'infection virale en raison de l'inflammation et de la régénération <sup>136</sup>.

Malgré sa dénomination de minichromosome, le cccDNA ne possède pas de centromère et peut ainsi être éliminé lors de la mitose. Des études effectuées sur le cccDNA du DHBV suggèrent que ces molécules sont transmises aux cellules filles <sup>137-139</sup>. Le génome épisomal des papillomavirus humains et des *Herpesviridae* s'attache de manière non covalente aux chromosomes cellulaires par l'intermédiaire d'une protéine virale pour une conversion et un partage efficace de leur génome lors de la division cellulaire <sup>140-143</sup>. Ce n'est pas le cas pour le VHB et les mécanismes par lesquels les molécules de cccDNA sont transmises aux cellules filles sont peu connus.

## 5. Zones d'ombres du cccDNA

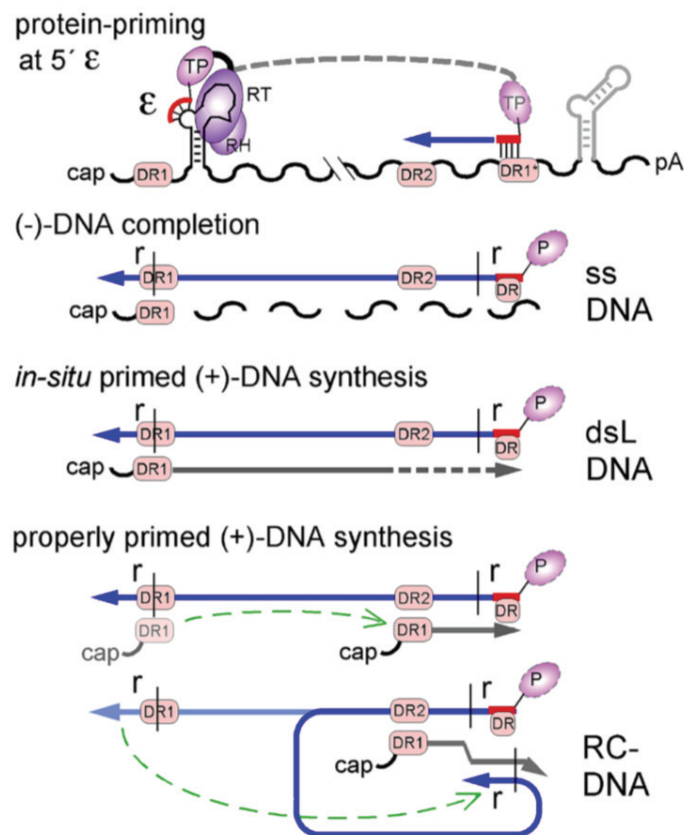
Plusieurs questions importantes quant à la biologie du cccDNA demeurent toujours sans réponses :

- Le cccDNA peut-il être éradiqué dans les cellules où il persiste via la stimulation de mécanismes immunologiques ?
- La longévité du cccDNA est-elle due à des molécules individuelles de cccDNA ou à un turnover de ce dernier. Et si c'est le cas, il n'est pas clair si cela se passe par une voie intracellulaire ou de cellule à cellule avec ou sans phase extracellulaire et avec quelle cinétique ?
- Les molécules de cccDNA survivent-elles à la division cellulaire et par quel mécanisme ?
- Les facteurs limitant la formation et l'accumulation du cccDNA dans la majorité des lignées hépatocytaires humaines et également dans les hépatocytes murins sont mal connus. De plus, pourquoi cette restriction est bien moins prononcée pour le DHBV, y compris dans des cellules humaines, reste obscur. Les mécanismes empêchant l'amplification à l'infini de cccDNA, même dans le modèle de canard, ne sont pas identifiés. Leur identification pourrait peut-être aider à développer des thérapies capables de réduire le nombre de copies de cccDNA chez les patients infectés. Par ailleurs, une quantification précise et standardisée du cccDNA sera nécessaire pour évaluer de nouveaux antiviraux ciblant le cccDNA.

### e. Encapsidation et rétrotranscription

L'ARNpg forme deux structures tige-boucle, une en 5' en aval de la coiffe (cap) et une en 3' en amont de la queue polyadénylée (pA). L'encapsidation de l'ARNpg et de la polymérase virale est initiée par un élément agissant en *cis* appelé epsilon ( $\epsilon$ ) en 5' de

l'ARNpg qui est le signal d'encapsidation <sup>144</sup>. Ensuite, la rétrotranscription de l'ARNpg débute et se déroule en plusieurs étapes (**Figure 13**).



**Figure 13 : Étapes de la rétrotranscription de l'ARNpg du VHB en rcDNA.**  $\epsilon$ , tige-boucle en 5' de l'ARNpg ; trait rouge, amorce de trois nucléotides ; cap, coiffe ; pA, queue polyadénylée. ssDNA, ADN simple brin ; dsL DNA, ADN double brin linéaire. D'après <sup>(32)</sup>.

D'abord, en 5' de l'ARNpg, la protéine P et une amorce (constituée de trois nucléotides produits par la polymérase virale) se fixent sur la tige-boucle  $\epsilon$  en 5' de l'ARNpg et déclenche l'encapsidation de l'ARNpg et de la polymérase dans une nouvelle nucléocapside et l'initiation de la transcription inverse <sup>145,146</sup>. Un résidu tyrosine unique en position 63 du domaine TP de P crée une liaison covalente tyrosyl-5'-DNA-phosphodiester avec l'amorce nucléique (**Figure 4**) qui sera maintenue jusqu'à la fin de la formation du rcDNA. Cette amorce permettra l'accrochage des premiers nucléotides du brin d'ADN (-). Les premiers 3 nucléotides du brin d'ADN (-) naissant (brin rouge sur **Figure 13**) liés à la polymérase subissent un transfert sur un motif accepteur correspondant à la séquence répétée DR1 en 3' de l'ARNpg.

La synthèse du brin d'ADN (-) à partir de l'ARNpg débute et un brin d'ADN (-) de taille unique (environ 10 nt) redondant (r) naît. Ensuite, la majorité de l'ARNpg est dégradée par l'activité RNase H de la polymérase P <sup>147</sup>. Les résidus non dégradés en 5' de l'ARNpg agissent comme amorce pour la synthèse du brin d'ADN (+). Il s'agit à ce stade d'un ADN simple brin « ssDNA ».

L'étape qui suit est le transfert de la séquence d'ARN coiffé qui porte la séquence DR1, à la séquence identique DR2 et l'extension jusqu'en 5' du brin d'ADN (-). Les deux extrémités du brin d'ADN (+), portant la même séquence (5' r et 3' r) et se retrouvant

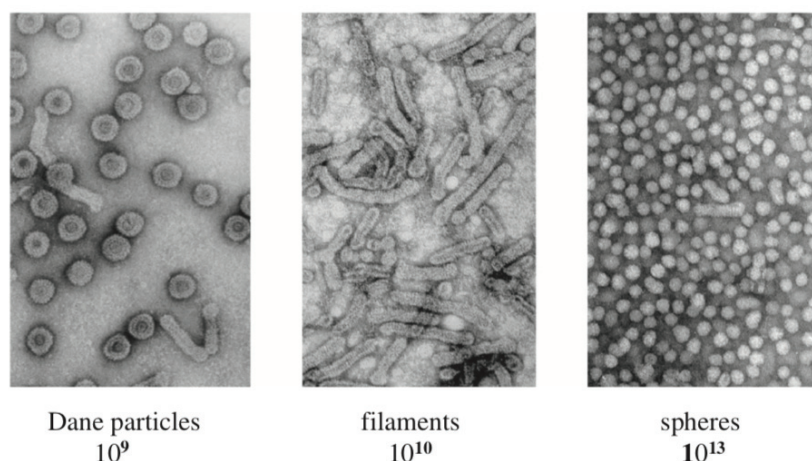


physiquement proches, permettent la translocation en 3' r du brin d'ADN (+) croissant, générant ainsi le rcDNA. Cette forme est constituée d'un brin d'ADN (-) plus long où le bout 5' est couplé de façon covalente à la protéine P et d'un brin d'ADN (+) incomplet dont le bout 5' est constitué d'une amorce ARN.

Dans une minorité de nucléocapsides, une extension directe (*in situ*) de l'amorce d'ARN donne une molécule d'ADN double brin linéaire « dsIDNA ». Cette structure linéaire ne peut donner naissance à un nouvel ARNpg. Cependant, si elle n'est pas dégradée, elle peut se circulariser en des « cccDNA-like molecules » par le mécanisme de réparation d'ADN de jonction d'extrémités non homologues (NHEJ). Comme le NHEJ est un mécanisme causant des erreurs <sup>148,149</sup> il en résulte des molécules non fonctionnelles et non infectieuses. Cependant, le dsIDNA est la forme la plus intégrée dans le chromosome de l'hôte <sup>150</sup> fréquemment observée dans les carcinomes hépatocellulaire associé au VHB <sup>151</sup>. Contrairement aux rétrovirus, l'intégration n'est pas catalysée par le virus (dépourvu du gène codant pour une intégrase) et n'est pas obligatoire pour la réplication des *Hepadnaviridae*.

#### f. Sortie du virus et des particules sous-virales

Une des caractéristiques des *Hepadnaviridae* est la sécrétion de plusieurs particules sous-virales (PSV) d'enveloppes non infectieuses par les cellules infectées, sous forme de filaments ou de sphères. La sécrétion des PSV entre en compétition avec le système immunitaire <sup>152</sup> et joue un rôle important dans le développement et la persistance de l'infection. Il a été montré que les PSV peuvent être jusqu'à 10.000 fois plus sécrétés que les virions infectieux appelés particules de Dane (**Figure 14**). Des études récentes suggèrent que les virions et les PSV utilisent des voies de sécrétions différentes <sup>153</sup>. Ces pseudo-particules dépourvues de génome viral sont en forme de sphères et de filaments et ne sont pas infectieuses. Cependant, elles sont utilisées en clinique pour le suivi de l'évolution de l'infection.



**Figure 14 : Morphologie des particules virales.** Images de microscopie électronique par coloration négative et nombres approximatifs des particules de Dane et sous-virales filamenteuses et sphériques dans 1 ml de sérum d'un patient chroniquement infecté par le VHB. D'après <sup>(2)</sup>.

Contrairement aux PSV, la sécrétion de virions implique des facteurs cellulaires de la voie des corps multivésiculaires <sup>154</sup>. Un apport insuffisant des protéines virales de surface favorise le recyclage du rcDNA au noyau, augmentant le nombre de copies de

cccDNA<sup>155</sup>. Les nucléocapsides contenant le génome interagissent avec les protéines d'enveloppe dans le complexe du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi et forment des virions matures. Ces derniers sortent des cellules via le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi sachant que ce phénomène reste encore peu décrit. Une étude récente a montré que les particules du VHB sont sécrétées des hépatocytes sous une forme « inactive » qui n'interagit pas avec les HPSGs. Les particules sont ensuite converties en particules dites « actives » qui exposent le domaine preS à la surface<sup>156</sup>.

## 9. Histoire naturelle

### a. Différence de l'évolution de l'infection en fonction de l'âge

L'histoire naturelle de l'infection du VHB varie largement en fonction de l'âge auquel l'infection est contractée. L'infection des adultes est une maladie résolutive pour plus de 90% des patients<sup>157</sup> chez qui on ne détecte plus de marqueurs de réplication virale avec apparition des anticorps anti-HBe et anti-HBs, menant à la cure fonctionnelle. À l'opposé, la transmission verticale de l'infection de la mère au nourrisson ou l'infection précoce en bas-âge conduit le plus souvent à une infection chronique par l'hépatite B caractérisée par l'absence d'une réponse antivirale de l'hôte avec le risque de développer une cirrhose du foie et un hépatocarcinome après des décennies d'évolution<sup>158</sup>.

Chez l'enfant en bas âge, l'immaturation de certaines fonctions spécifiques de l'hôte permet vraisemblablement à l'infection du VHB d'évoluer vers la chronicité. Pour expliquer le si fort pourcentage de chronicité du VHB après une transmission materno-foetale ou une infection à un jeune âge, l'immaturation du système immunitaire est généralement incriminée et on suppose qu'elle induit un état de tolérance immunitaire qui favorise la persistance du VHB. Par exemple, une étude a montré que dans un modèle de souris infectées par le VHB par transfection hydrodynamique, les souris exposées aux AgHBe *in utero* n'étaient pas capables d'éliminer efficacement l'infection par le VHB plus tard dans la vie<sup>159</sup>. Cette vision est cependant contrebalancée par d'autres études. En effet, il a été rapporté que l'exposition au VHB *in utero* pouvait à l'inverse induire la maturation des cellules de l'immunité innée et le développement d'une réponse Th1 qui à son tour augmentait la capacité des cellules immunitaires du sang du cordon ombilical à répondre à l'infection bactérienne *in vitro*<sup>160</sup>. Par ailleurs, plusieurs mécanismes pourraient également entraver la réponse des lymphocytes T contre le VHB mais d'une manière cette fois indépendante de l'âge. Dans un modèle murin, une délétion des lymphocytes T CD4+ spécifiques du VHB a été observée, en conséquence d'une rétention intrahépatique médiée par des chimiokines produites par les macrophages intrahépatiques<sup>161</sup>. De plus, les AgHBs et AgHBe inhibent la signalisation de TLR7 et TLR9 aboutissant à un mécanisme par lequel le VHB peut échapper à la réponse immunitaire innée<sup>162,163</sup>.

L'environnement métabolique intrahépatique pourrait également être responsable de la faible réponse des lymphocytes T contre le VHB observée à toutes les étapes de l'hépatite B chronique. Les cellules myéloïdes suppressives inhibent fortement les lymphocytes T d'une manière partiellement dépendante de l'arginase. Les lymphocytes T privés de L-arginine augmentent l'absorption des nutriments essentiels et subissent une reprogrammation métabolique<sup>164</sup>. De nombreux mécanismes peuvent donc limiter la réponse immunitaire spécifique au VHB et la question de savoir si la tolérance immunitaire au VHB dépend de l'âge et s'il s'agit du seul ou du principal facteur qui

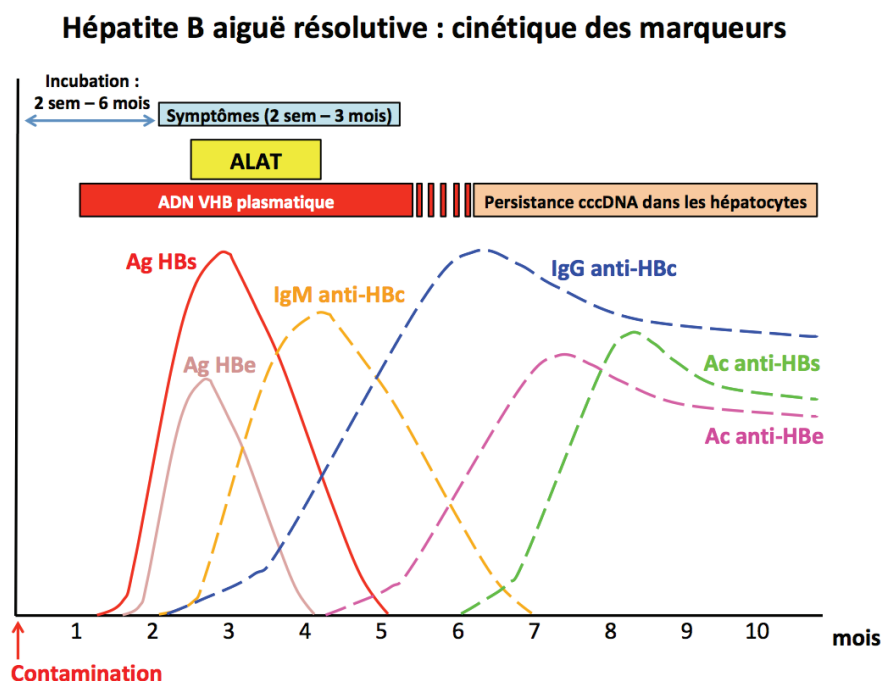
mène à une hépatite B chronique n'est pas clair. Outre la réponse immunitaire, il est probable que d'autres fonctions physiologiques immatures au cours des premières années de la vie pourraient favoriser la persistance virale et contribuer à la chronicité de l'évolution.

## b. Évolution de l'infection

Le suivi de l'évolution de l'infection repose sur différents marqueurs. On distingue des marqueurs de la réplication virale (antigènes et ADN viral), de la réponse immunitaire (anticorps dirigés contre les antigènes viraux) ou des lésions hépatiques (les aminotransférases entre autres). Quel que soit le type d'infection, la période d'incubation du virus varie entre 2 semaines et 6 mois.

### 1. Cas d'une hépatite B aiguë « résolutive »

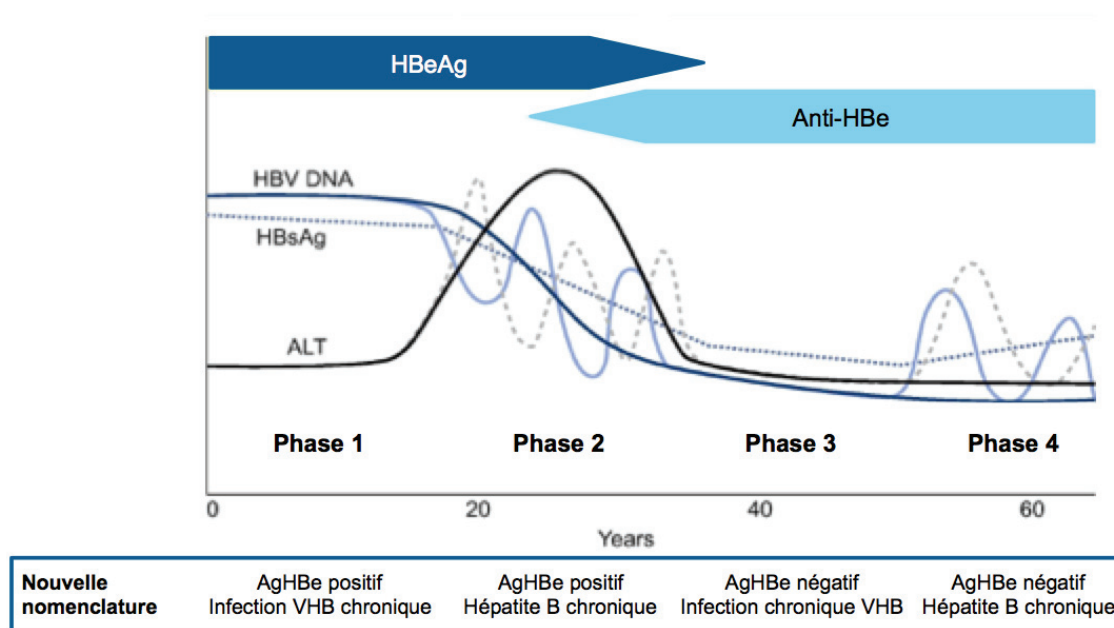
Au cours de l'hépatite B aiguë (**Figure 15**), l'AgHBs suivi de l'AgHBe sont détectables un à deux mois après l'infection et atteignent leurs pics de sécrétions entre le 2<sup>ème</sup> et le 3<sup>ème</sup> mois post-infection. Puis il y a apparition des anticorps anti-HBc (2<sup>ème</sup> mois) et séroconversion HBe et HBs avec apparition des anticorps anti-HBe suivis des anti-HBs. La séroconversion HBs définit le caractère « résolutif » de l'infection, les anticorps anti-HBs assurant l'immunoprotection contre une nouvelle infection. Cependant, malgré la résolution de l'infection, des molécules de cccDNA peuvent persister dans les hépatocytes avec un risque de réactivation chez certains patients en cas d'immunodépression.



**Figure 15 : Cinétique des marqueurs d'une hépatite B aiguë résolutive chez l'adulte.**  
ALAT, alanine transaminase ; sem, semaine.

## 2. Évolution de l'hépatite B chronique

L'infection chronique par le VHB est un processus d'interaction dynamique entre la réplication du VHB et la réponse immunitaire de l'hôte. Les patients avec une infection chronique du VHB ne développent pas nécessairement une hépatite B chronique (HBC). L'histoire naturelle de l'infection chronique au VHB est divisée en 5 phases prenant en considération la présence de l'AgHBe, le niveau de l'ADN du VHB, les valeurs de l'alanine aminotransférase (ALT) et surtout la présence ou l'absence d'une inflammation hépatique. Une nouvelle nomenclature de ces étapes a été présentée en 2017 par le conseil d'administration de l'association européenne pour l'étude du foie (EASL) et qui distingue clairement « l'infection » de « l'hépatite » <sup>165</sup> (**Figure 16**).



**Figure 16 : Phases d'évolution de la chronicité du VHB.** Représentation des variations de l'ADN du VHB dans le sérum (trait bleu foncé), de l'alanine aminotransférase (trait noir), des AgHBs (pointillés bleu clair) et de la présence d'AgHBe (flèche bleu foncé) et d'anticorps anti-HBe (flèche bleu clair) au cours du temps (années). L'encadré indique la nouvelle nomenclature de chacune des phases. D'après <sup>(165)</sup>.

La phase 1 dite « AgHBe positif - Infection chronique au VHB » anciennement appelée « phase de tolérance immune » est caractérisée par la présence de l'AgHBe sérique avec un niveau d'ADN viral élevé et d'ALT faible ne dépassant pas la limite supérieure de la normale (LSN) fixée à 40 UI/ml <sup>166</sup>. Cette phase s'accompagne d'une faible nécroinflammation hépatique. Un niveau élevé d'intégration de l'ADN du VHB et une expansion clonale des hépatocytes a lieu suggérant que l'hépatocarcinogenèse puisse être déjà en cours durant cette phase précoce <sup>166,167</sup>. Le taux de perte spontanée des AgHBe est très faible et les patients sont fortement contagieux durant cette phase du fait des niveaux élevés d'ADN viral.

La phase 2 dite « AgHBe positif – Hépatite B chronique » anciennement appelée « phase de clairance immune » est caractérisée par la présence de l'AgHBe dans le sérum et de niveaux élevés de l'ADN viral et d'ALT. Contrairement à la phase 1, la nécroinflammation hépatique est modérée ou sévère avec progression accélérée vers une fibrose <sup>166</sup>.

Ce stade peut survenir plusieurs années après la phase 1 et est plus fréquemment ou rapidement atteint chez les sujets infectés à l'âge adulte. Le résultat de cette phase est variable. En effet, la majorité des patients peuvent obtenir une séroconversion de l'AgHBe avec suppression de l'ADN viral et entrer dans la phase 3. D'autres patients échouent à contrôler le virus et progressent vers la phase 4 pour plusieurs années.

La phase 3 dite « AgHBe négatif – Infection chronique au VHB » anciennement appelée « Phase de portage inactif du VHB » est caractérisée par la présence d'anticorps anti-HBe dans le sérum avec des niveaux d'ADN viral faibles (<2000 UI/ml) et des niveaux d'ALT < LSN. Les patients ont un faible risque de progresser vers une cirrhose ou un HCC s'ils demeurent dans cette phase mais la progression vers la phase 4 peut avoir lieu.

La phase 4 dite « AgHBe négatif – Hépatite B chronique » est caractérisée par l'absence d'AgHBe sérique avec le plus souvent des anticorps anti-HBe détectables et des niveaux d'ADN viral sérique persistant ou fluctuant de modérés à élevés ainsi que des valeurs d'ALT pouvant fluctuer ou rester élevées. L'histologie du foie à cette étape montre une nécroinflammation et une fibrose <sup>166</sup>. La majorité des sujets sont porteurs de variants du VHB dans la région promotrice de core et/ou précore altérant ou abolissant l'expression de l'AgHBe. Cette phase est associée à de faibles taux de rémissions spontanées de la maladie.

La phase 5 dite « infection occulte par le VHB » est une phase caractérisée par l'absence d'AgHBs dans le sérum et la présence d'anticorps anti-HBc, avec ou sans anticorps anti-HBs détectables. Les patients dans cette phase ont des niveaux d'ALT normaux et parfois mais pas toujours un ADN viral non détectable dans le sérum. Le cccDNA peut fréquemment être détecté dans le foie. En cas d'immunosuppression, une réactivation de la réplication virale peut avoir lieu chez ces patients.

## 10. Prophylaxie

Au printemps 1975, Philippe Maupas et son équipe à Tours, publie les premiers résultats d'une vaccination contre le VHB en utilisant des particules virales vides contenant des protéines d'enveloppe purifiées à partir de sérum de patients chroniquement infectés par le VHB <sup>168</sup>. En 1980, le vaccin est mis en vente par l'Institut Pasteur sous le nom de Hevac B Pasteur. Depuis une nouvelle génération de vaccins recombinants ont vu le jour et sont actuellement les seuls utilisés <sup>169</sup>. Le vaccin contre l'hépatite B joue un rôle central dans les stratégies de prévention du VHB dans le monde avec une diminution de l'incidence et de la prévalence de l'infection par le VHB. De plus, le succès de la vaccination en matière de prévention de l'hépatocarcinome a permis de démontrer pour la première fois chez l'Homme une relation de cause à effet entre un processus cancéreux et une infection virale. Le vaccin contre l'hépatite B est le premier vaccin anti-cancéreux efficace <sup>170</sup>. Cependant, il a été recensé plusieurs infections de personnes pourtant immunisées contre le VHB par vaccination. Notamment, il a été recensé en Gambie, des infections sur des enfants par des mutants du VHB du génotype E <sup>171</sup> et à Taiwan, par des mutants du gène de surface des génotypes B et C sur des enfants <sup>172</sup> et des adultes <sup>173</sup> tous étant vaccinés et ayant répondu au vaccin.



## 11. Traitements

### a. Objectifs : cure fonctionnelle et cure totale

D'après le dernier atelier de l'agence nationale de recherche sur le sida et les hépatites virales (ANRS) <sup>174</sup>, une cure fonctionnelle est l'équivalent d'une infection aiguë résolutive. Elle se traduit par la perte des AgHBs avec ou sans séroconversion d'anticorps anti-HBs, par l'absence d'ADN viral dans le sérum et par la persistance de cccDNA transcriptionnellement inactif permettant d'envisager l'arrêt du traitement. Une cure totale présente les mêmes caractéristiques d'une cure fonctionnelle mais avec l'élimination physique du cccDNA. Cette cure totale reste aujourd'hui utopique d'autant plus qu'on ne sait pas encore comment déterminer si le cccDNA est complètement éliminé.

### b. Traitements actuels

Les traitements actuels contre l'hépatite B chronique reposent sur les analogues nucléotidiques (NUCs) qui sont des inhibiteurs de la polymérase virale ou sur les interférons de type 1 <sup>175</sup>. Les NUCs (lamivudine, telbivudine, adéfovir, ténofovir et entécavir) sont de puissants inhibiteurs de la transcriptase inverse qui bloquent la rétrotranscription de l'ARN viral et donc la formation de virions infectieux empêchant ainsi l'infection de nouveaux hépatocytes non infectés. Lorsque c'est possible, l'entécavir ou le ténofovir sont les traitements recommandés en première intention actuellement en cas d'hépatite chronique. Ces molécules réduisent le risque de fibrose et de cancer de foie mais n'affectent pas la persistance du génome viral ou l'expression des protéines virales. Les NUCs n'augmentent pas de manière significative le taux spontané de cure fonctionnelle et une interruption du traitement est généralement suivie d'une réactivation virale délétère. De plus, certains NUCs peuvent perdre de leur efficacité lors d'un traitement à long terme à cause d'apparition de mutations de résistance <sup>176</sup>.

Les interférons peuvent augmenter le taux de cure fonctionnelle mais uniquement pour un faible pourcentage de patients. Les défenses antivirales naturellement acquises ou stimulées par l'interféron peuvent donc chez certains patients réprimer efficacement la réplication virale permettant une survie sans traitement, mais elles n'éradiquent pas totalement le virus.

Ces observations indiquent que les réponses antivirales de l'hôte peuvent être suffisantes pour au moins contrôler la maladie. Ils suggèrent aussi que la modulation des voies spécifiques de l'hôte qui régulent la réplication du VHB peut être une piste prometteuse sur le plan thérapeutique.

### c. Traitements en cours d'étude

#### 1. Les inhibiteurs d'entrée du virus

La forte affinité entre la région N-terminal myristoylé du domaine preS1 de la protéine L (2-75) avec le récepteur NTCP et probablement d'autres facteurs cellulaires <sup>177</sup> déclenche l'absorption du virion par la cellule. Il est possible d'inhiber l'entrée du VHB avec uniquement 46 acides aminés du domaine preS1 (2-48) myristoylés en N-terminal appelé Myrcludex B <sup>178</sup>.

## 2. Les bloqueurs de la réparation du rcDNA en cccDNA

La découverte du rôle du facteur cellulaire TDP2 dans le clivage de la liaison covalente entre le rcDNA et la polymérase a montré que la redondance entre les facteurs de l'hôte pouvait sérieusement limiter la possibilité de développer des stratégies de ciblage spécifiques. Néanmoins, une récente étude a montré que deux composés structurellement reliés, nommés CCC-0975 et CCC-0346, pouvaient bloquer la formation du cccDNA et ainsi servir de candidats potentiels thérapeutiques pour empêcher la formation initiale et ou le maintien du cccDNA <sup>179</sup>.

## 3. Les inhibiteurs de l'assemblage de la capsid

Les protéines de la capsid représentent une cible prometteuse pour des antiviraux à action directe contre le VHB. Grâce à la connaissance de la structure tridimensionnelle de HBc plusieurs classes de petites molécules non nucléosidiques ont été développés. Ces molécules inhibent l'encapsidation de l'ARNpg ou altèrent la formation de la capsid conduisant à l'arrêt de synthèse du rcDNA <sup>180</sup>. Ces modulateurs allostériques de HBc (CpAM) peuvent inhiber la réplication des mutants du VHB résistants au analogues nucléotidiques <sup>181</sup>.

## 4. Les modulateurs des récepteurs de type Toll (TLR)

Les cellules dendritiques plamacytoïdes (pDC) et les cellules myéloïdes sont deux types cellulaires spécialisés dans la production d'IFN- $\alpha$  et d'IFN- $\lambda$  au cours de la stimulation des TLR 7/9 ou TLR3. Une fois activé ces cellules peuvent activer d'autres cellules de l'immunité inné et adaptative <sup>182,183</sup>. Un agoniste de TLR7, le GS-9620, a montré un fort effet antiviral avec une réduction de 2 log<sub>10</sub> de la virémie chez le chimpanzé <sup>184</sup>. Cela a aussi été confirmé chez la marmotte infectée où il a été montré que le cccDNA pouvait être réduit. Un essai clinique de phase II comparant la combinaison du ténofovir et du GS-9620 à la monothérapie au ténofovir est en cours d'essai.

## 5. Les siRNA

L'utilisation de l'interférence ARN (RNAi) pour inhiber la réplication du VHB a été évalué *in vitro* et validé dans des modèles animaux <sup>185</sup>. Trois molécules de siRNA (small interfering RNA) sont ou seront en essais cliniques incluant ARC-520 (phase II), ARB-1467 (phase II) et ALN-HBV (phase I/II).

## 6. Dégradation du cccDNA par l'IFN $\alpha$ et l'agoniste de LT $\beta$ R

Une récente étude a montré que dans des hépatocytes primaires humains et des cellules HepaRG différenciées infectées par le VHB, le traitement par l'IFN $\alpha$  ou un agoniste du récepteur à la lymphotoxine  $\beta$  (LT $\beta$ R) induit l'expression de deux cytidines désaminases, APOBEC3A et APOBEC3B qui sont ensuite recrutées sur le cccDNA par la protéine de capsid HBc. Le cccDNA désaminé est ensuite sujet à la réparation d'ADN et finalement dégradé par un mécanisme impliquant l'endonucléase 1 apurinique/aprimidinique (APE1) sans affecter l'ADN génomique ou causer d'hépatotoxicité mettant en avant ce traitement comme une alternative thérapeutique <sup>186</sup>.

## 7. Dégradation du cccDNA par CRISPR/CAS9

Plusieurs technologies ciblant des séquences spécifiques de l'ADN du VHB ont été évaluées *in vitro* sur des cultures cellulaires et *in vivo* sur des modèles murins : certaines endonucléases ou méganucléases de l'hôte, des nucléases effectrices de type activateur de transcription (TALEN)<sup>187,188</sup>, des protéines à doigts de zinc (ZFP)<sup>189-191</sup> ou encore les courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées associée à la protéine 9 (CRISPR/CAS9)<sup>192-197</sup>. Un défi majeur pour l'application clinique de ces molécules est de cibler de manière efficace et spécifique les cellules infectées par le VHB *in vivo* et d'induire la dégradation du cccDNA<sup>198</sup>.

La grande différence des conséquences de l'infection par le VHB selon l'âge auquel l'infection est contractée est toujours incomprise. L'incapacité des nouveau-nés à contrôler le VHB suggère que certaines fonctions physiologiques indispensables au contrôle de ce virus sont immatures chez les jeunes enfants. Outre le système immunitaire, plusieurs arguments appuyant l'hypothèse que la voie métabolique des acides biliaires soit une de ses fonctions importantes est intéressante à explorer.



*« Chez d'autres, il n'y a ni flatulences ni bile noire mais simplement colère sans mélange, chagrin et abattement terrible. Ceux-là aussi, nous les appelons mélancoliques, car la bile est synonyme de colère, et la bile noire, de colère violente et sauvage. »*

*in Arétée de Cappadoce*

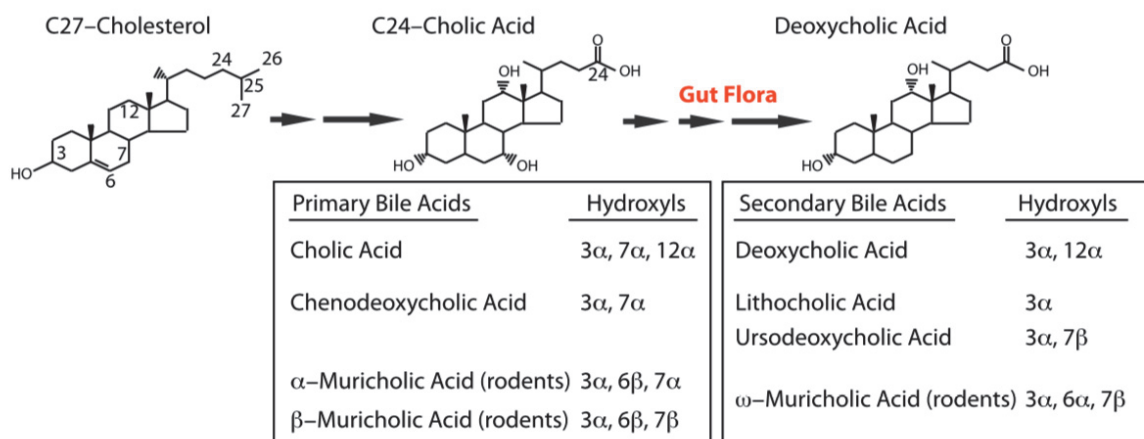
I<sup>er</sup> siècle apr. J.-C.

## II. VHB et métabolisme des acides biliaires

C'est en 1848 que la première description d'un acide biliaire a été faite lorsque l'acide cholique (CA) a été découvert dans la vésicule biliaire du bœuf. Au début des années 1900, des études ont permis d'identifier d'autres acides biliaires tel que l'acide lithocholique (LCA), l'acide chénodéoxycholique (CDCA), l'ursodéoxycholique (UDCA) et l'acide muricholique (MCA) respectivement du bœuf, de l'oie, de l'ours et des rongeurs comme décrit par Wieland lors de son discours à la remise du prix Nobel de chimie en 1928 <sup>199</sup>.

### 1. Structure des acides biliaires

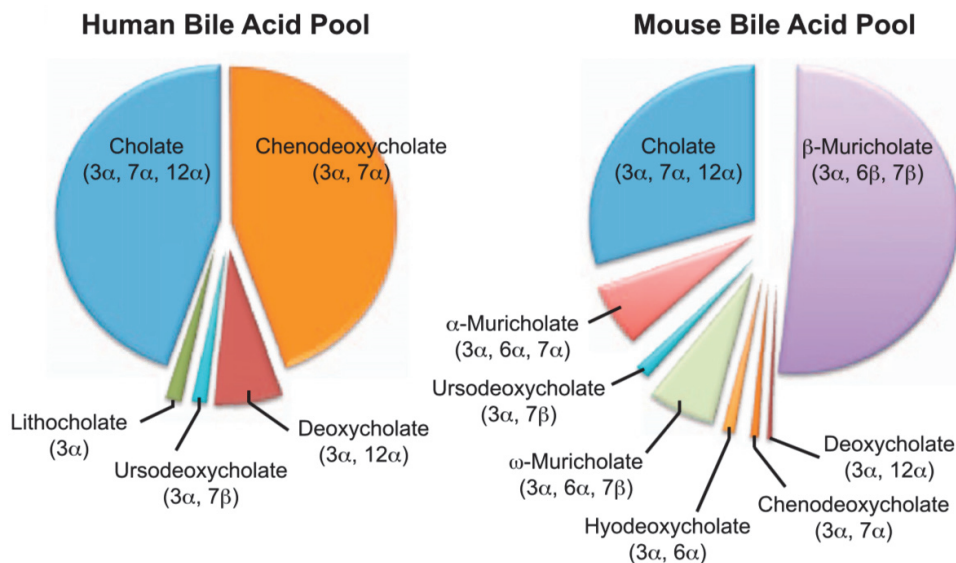
Les acides biliaires sont des molécules solubles dérivées du catabolisme du cholestérol qui est fortement insoluble (**Figure 17**). En majorité, les acides biliaires sont composés de 4 anneaux stéroïdiens formant un réseau hydrocarboné avec une face hydrophobe convexe et une face hydrophile concave contenant des groupes hydroxyles et une courte chaîne latérale acide à cinq carbones qui est par la suite amidée avec de la taurine ou de la glycine pour former les sels biliaires. Cette structure amphipathique confère aux acides biliaires les propriétés de détergents qui permettent la formation de micelles et facilitent la digestion et l'absorption des lipides alimentaires et des vitamines liposolubles A, D, E et K de l'intestin grêle. La présence ou l'absence des groupes hydroxyles dans les orientations  $\alpha$  ou  $\beta$  des positions 3, 6, 7 et 12 sur le squelette carboné du stérane affecte à la fois leur solubilité et leur hydrophobicité. Les acides biliaires sont classés de la façon suivante du plus hydrophobe au plus hydrophile : LCA – DCA – CDCA – CA – UDCA – MCA.



**Figure 17 : Structure et métabolisme des acides biliaires.** Le cholestérol est catabolisé par les enzymes hépatiques en acides biliaires primaires qui sont par la suite déconjugués en acides biliaires secondaires par les enzymes bactériennes de la flore intestinale. D'après <sup>(200)</sup>.

## 2. Différence de composition du pool d'acides biliaires entre l'Homme et la souris

Les différentes espèces d'acides biliaires constituent un pool d'acides biliaires qui varie entre les mammifères, notamment entre l'Homme et la souris. Les acides biliaires majoritaires sont le CA et le CDCA chez l'Homme et l'acide  $\beta$ -muricholique ( $\beta$ -MCA) chez la souris (**Figure 18**). Cette différence affecte la signalisation des voies dépendantes des acides biliaires.



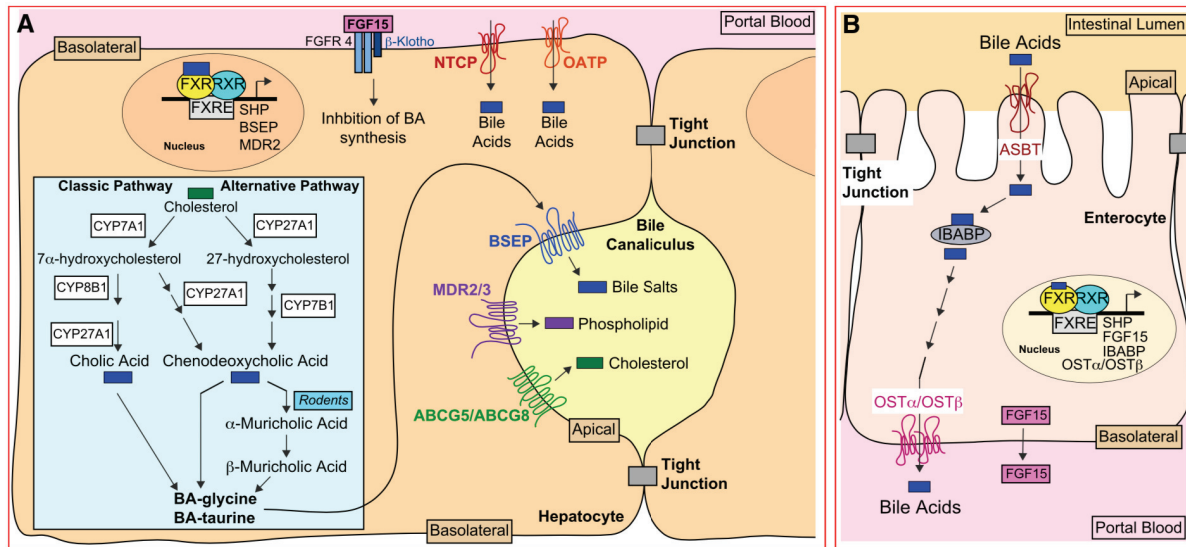
**Figure 18 : Composition relative des acides biliaires chez l'Homme et la souris.** D'après (200).

## 3. Circuit entéro-hépatique

Les acides biliaires dérivent du catabolisme du cholestérol dans les hépatocytes dans un processus qui implique 2 voies principales et l'activation d'au moins 17 enzymes hépatiques. La voie classique, qui compte pour la majorité de la synthèse des acides biliaires est régulée par une enzyme limitante qui est le cholestérol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1). Une voie alternative implique une première étape enzymatique catalysée par le stérol-27-hydroxylase (CYP27A1) suivie par l'hydroxylation des acides biliaires par l'oxystérol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7B1) (**Figure 19 A**). Les 2 voies génèrent des acides biliaires primaires qui sont les produits finaux du cholestérol et qui sont conjugués à la taurine et à la glycine avant d'être excrétés des hépatocytes<sup>201-203</sup>. Cette conjugaison forme ainsi des sels biliaires avec un pKa abaissé et une augmentation de leur solubilité facilitant ainsi la formation des micelles dans l'environnement acide du duodénum. Contrairement aux acides biliaires non conjugués qui peuvent diffuser à travers les membranes, les sels biliaires requièrent un transporteur transmembranaire, bile salt export pump (BSEP), pour être excrétés<sup>204</sup>.

Les sels biliaires excrétés dans le duodénum sont réabsorbés dans l'iléon distal via le transporteur sodium dépendant, apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT), présent au pôle apical des entérocytes. La protéine intestinale de fixation aux acides biliaires, ileal bile acid binding protein (IBABP), facilite le transport des sels biliaires des

entérocytes jusqu'à la membrane basolatérale où ils sont sécrétés dans le sang à travers le transporteur hétérodimérique OST $\alpha$ /OST $\beta$  (**Figure 19 B**).



**Figure 19 : Circuit entéro-hépatique des acides biliaires.** A) Schéma d'hépatocytes montrant la voie classique ou alternative de biosynthèse des acides biliaires qui génère les acides biliaires conjugués à la glycine ou à la taurine (dits sels biliaires). Sont représentés la localisation des transporteurs lipidiques BSEP, MDR2/3 et ABCG5/ABCG8 sur la membrane apicale et la localisation des transporteurs NTCP et OATP qui facilitent la récupération des acides biliaires du sang. FGF15 sécrété dans la veine porte provenant de l'intestin se fixe sur son récepteur FGFR4/ $\beta$ -Klotho menant à la suppression de la synthèse d'acides biliaires. Trois gènes cibles de FXR (SHP, BSEP et MDR2/3) sont représentés dans le noyau. B) Schéma d'entérocytes dans l'iléon distal montrant l'absorption des acides biliaires du lumen intestinal à travers le récepteur ASBT et la sécrétion des acides biliaires vers la veine porte à travers OST $\alpha$ /OST $\beta$ . Les gènes cibles de FXR (SHP, FGF15/19, IBABP, OST $\alpha$  et OST $\beta$ ) sont représentés ainsi que la sécrétion de FGF15 dans la veine porte. D'après (200).

## 4. Le farnésoid X receptor $\alpha$ (FXR $\alpha$ )

### a. Généralités

Le farnésoid X receptor (FXR; NR1H4) a été identifié en 1995 chez la souris<sup>205</sup> et le rat<sup>206</sup> comme récepteur nucléaire initialement orphelin. Le nom de farnésoid X receptor a d'abord été attribué car dans les premières études, le farnésol et ses métabolites ont été proposés comme ligands possibles de FXR chez le rat<sup>206</sup>. Mais ce récepteur devait s'appeler récepteur des acides biliaires puisque par la suite, ce sont les acides biliaires qui ont été identifiés comme les principaux ligands endogènes de FXR<sup>207-209</sup>. Il existe une centaine de composés identifiés comme ligands potentiels de FXR avec différents degrés d'affinité qui incluent les acides biliaires endogènes et des ligands synthétiques. Plusieurs composés présentent une forte affinité de fixation avec une activité d'agoniste envers FXR notamment les stéroïdes, les aromates, les terpénoïdes, les alcaloïdes et les acides gras. En plus de FXR $\alpha$ , les rongeurs expriment FXR $\beta$  (NR1H5) qui est activé par le lanostérol mais insensible aux acides biliaires<sup>210</sup>. À l'opposé, le FXR $\beta$  humain est un pseudogène.

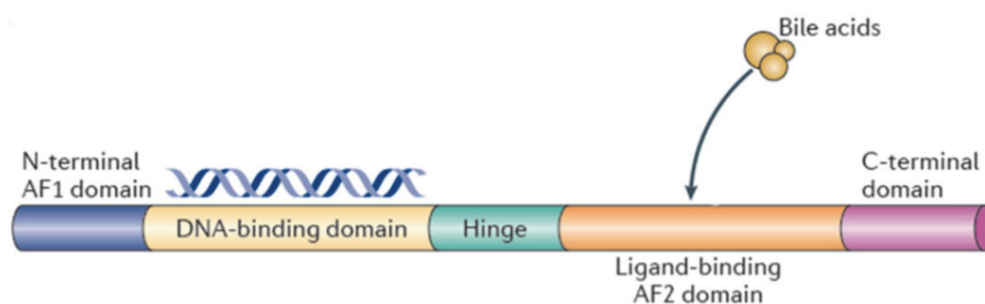
## b. Isoformes de FXR $\alpha$

Il existe 4 isoformes de FXR $\alpha$  chez l'Homme et 3 chez la souris qui résultent de l'utilisation alternative du promoteur et de l'épissage alternatif de l'ARN <sup>211</sup>. L'expression de ces isoformes diffère dans les cellules et les tissus qui sont impliqués dans le métabolisme des acides biliaires et où FXR $\alpha$  est fortement exprimé (hépatocytes, entérocytes de l'iléon et tubes rénaux). Malgré le fait que FXR $\alpha$  soit fortement exprimé dans la glande surrénale, cet organe n'a pas de rôle connu dans le métabolisme des acides biliaires. Il reste encore à établir si le très faible niveau de FXR $\alpha$  présent dans les tissus périphériques, comme le tissu adipeux, le cœur, les cellules  $\beta$  pancréatiques et la paroi artérielle sont suffisants pour directement affecter l'expression génique et le métabolisme *in vivo*.

## c. Structure de FXR $\alpha$

FXR $\alpha$  est l'un des 48 membres de la superfamille des récepteurs nucléaires humains des facteurs de transcription dont la structure a été conservée au cours de l'évolution. Cette structure comprend plusieurs domaines (**Figure 20**) :

- Un domaine AF1 (Activation Function 1) en N-terminal et reconnu par des cofacteurs ou d'autres facteurs de transcription.
- Un domaine de liaison à l'ADN (DBD) qui comprend 2 structures en doigt de zinc responsables de la fixation à des séquences nucléotidiques spécifiques sur le génome (NRRE).
- Une région charnière qui permet la flexibilité de la structure.
- un domaine de liaison aux ligands (LBD) et d'activation additionnel (AF2) qui permet au récepteur de se dimériser et d'interagir avec des cofacteurs <sup>212,213</sup>.



**Figure 20 : Structure des récepteurs nucléaires, exemple de FXR $\alpha$ .** Le domaine N-terminal comprend un domaine de transactivation AF1 suivi d'un domaine de fixation à l'ADN (DBD) puis d'un domaine de liaison du ligand (LBD) et un domaine de transactivation AF2 en C-terminal. D'après (<sup>214</sup>).

#### d. Eléments de réponses de FXR $\alpha$ (FXRE)

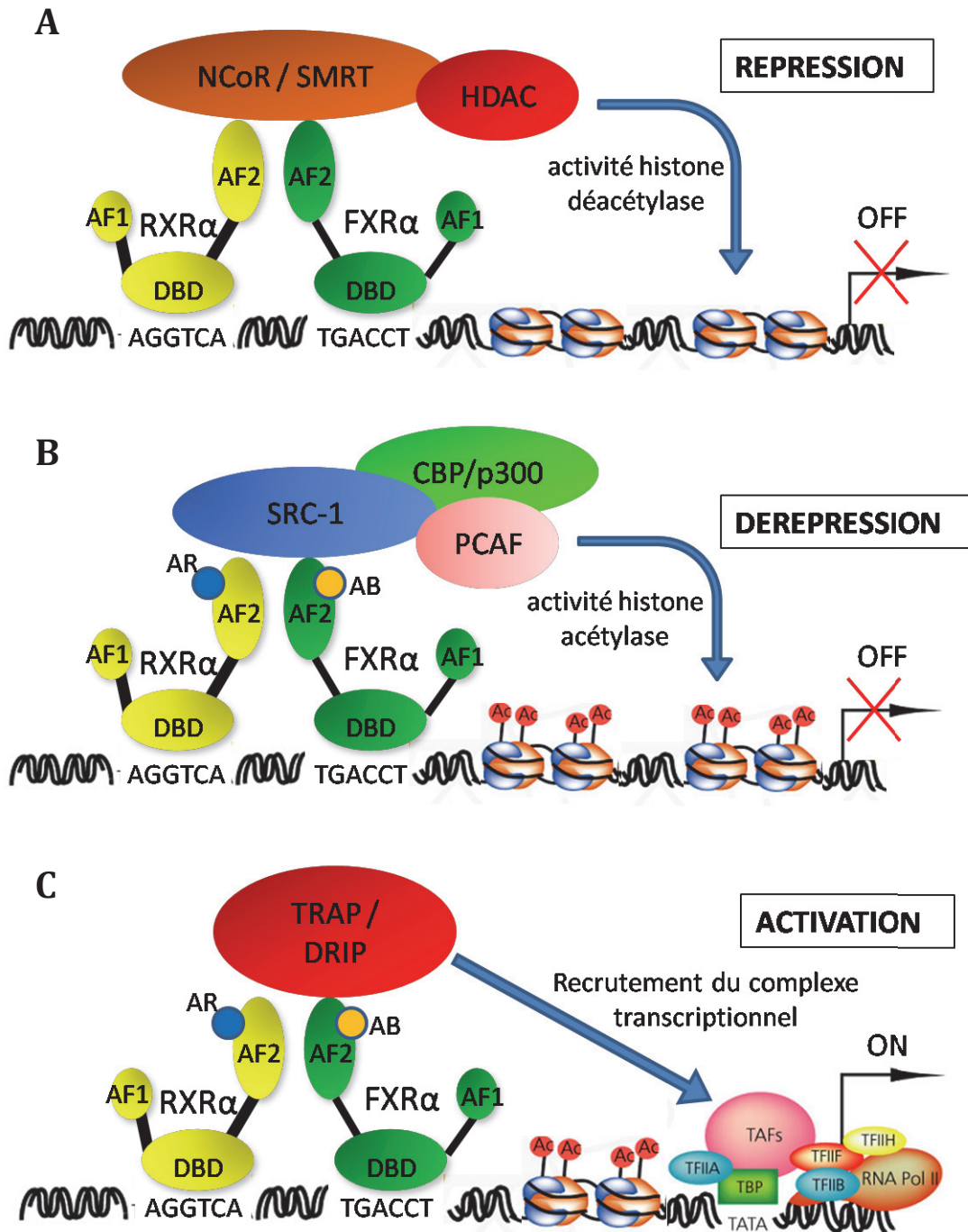
FXR $\alpha$  se fixe à ses éléments de réponses (FXRE) seul, en homodimère ou comme un hétérodimère avec RXR $\alpha$  <sup>215</sup>. Le FXRE prototypique contient deux copies d'une séquence de 6 nucléotides, AGGTCA ou d'une séquence apparentée, disposées sous la forme de répétitions inversées séparées par un nucléotide, appelé IR-1 (Inverted repeat 1) <sup>216</sup>. L'analyse génomique des sites de fixation à FXR $\alpha$  a révélé qu'uniquement 10% des FXRE sont présents dans les promoteurs à proximité des gènes alors que 90% des FXRE sont présents dans les introns et les régions intergéniques <sup>217,218</sup>.

#### e. Mécanisme d'action de FXR $\alpha$

L'activité de FXR $\alpha$  est modulée par la fixation de ses ligands. Contrairement aux récepteurs nucléaires de classe I qui en absence de leurs ligands sont localisés dans le cytoplasme, FXR $\alpha$  et les récepteurs nucléaires de classe II sont majoritairement présents sur leurs séquences de reconnaissances (NRRE) au niveau des régions promotrices même en absence de leurs ligands. Des corépresseurs de la transcription sont alors recrutés tels que NCoR (Nuclear receptor corepressor) et SMRT (Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors) réprimant ainsi l'expression des gènes. Les corépresseurs recrutent eux-mêmes des protéines à activité histone déacétylase (HDAC) qui en déacétylant les histones, rendent la chromatine compacte et peu accessible à la machinerie transcriptionnelle **(Figure 21 A)**.

La fixation du ligand sur FXR $\alpha$  entraîne un changement conformationnel qui permet le détachement du complexe corépresseur et le recrutement d'un complexe de coactivateurs de la transcription tel que SRC-1 (Steroid receptor coactivator-1) et des protéines à activité histone acétyltransférase telles que CBP/p300 (CREB binding protein/p300) et PCAF (CBP/p300 associated proteins) **(Figure 21 B)**. L'acétylation des histones par ces protéines permet la décondensation de la chromatine et le recrutement du complexe transcriptionnel **(Figure 21 C)** <sup>219,220</sup>.





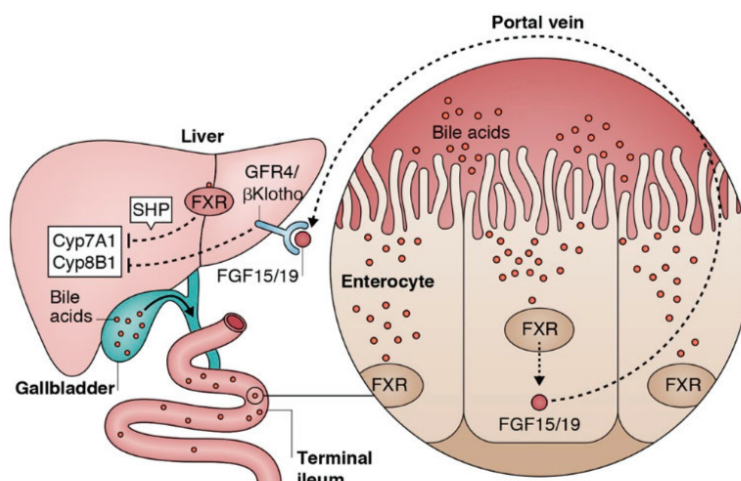
**Figure 21 : Mode d'action de FXR $\alpha$ .** L'hétérodimère FXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  se fixe sur une séquence répétée inverse au niveau du promoteur d'un gène cible. Les 3 étapes de l'activation de la transcription se distinguent par l'absence ou la présence des ligands des récepteurs nucléaires, la nature des corépresseurs ou coactivateurs recrutés, et leur effet sur l'acétylation des histones. AR, acide réinoïque (boule bleue) ; AB, acide biliaire (boule orange) ; AF, activation function ; DBD, DNA binding domain ; NCoR, nuclear receptor co-repressor ; SMRT, silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor ; HDAC, histone deacetylase ; CBP, CREB-binding protein ; SRC-1, steroid receptor coactivator 1 ; Ac, histone acétylé ; TRAP, Thyroid hormone receptor-associated protein ; DRIP, vitamin D receptor interacting protein ; TFII, Transcription factor II ; TBP, TATA-binding protein ; TAF, TATA-binding protein associated factor ; RNA pol II, RNA polymerase II. Adapté de (220).

## f. Rôles physiologiques de FXR $\alpha$

### 1. Rôle dans le métabolisme des acides biliaires

Le rôle le plus décrit de FXR $\alpha$  est son rôle central dans le maintien de l'homéostasie des acides biliaires dans le foie qui, à des concentrations élevées, est toxique pour l'hépatocyte. Pour cela, FXR $\alpha$  module positivement ou négativement la transcription de gènes menant à la diminution de synthèse des acides biliaires dans la cellule, la diminution de synthèse du récepteur d'entrée des acides biliaires (NTCP) et l'augmentation de synthèse de la pompe excrétrice des acides biliaires (BSEP).

FXR $\alpha$  est fortement exprimé dans le foie et l'iléon où il régule différentes voies de transcriptions <sup>217</sup>. FXR $\alpha$  régule négativement la synthèse d'acides biliaires directement dans le foie en induisant l'expression de SHP qui réprime à son tour l'expression de LRH-1 aboutissant à une diminution de la transcription de CYP7A1 <sup>221</sup> (**Figure 22**). L'activation du FXR $\alpha$  intestinal a des effets sur le foie. Le facteur de croissance des fibroblastes 19 (FGF19) chez l'homme et 15 (FGF15) chez la souris est fortement exprimé dans l'intestin grêle <sup>222,223</sup>. FGF15/19 sécrétés par l'intestin circule vers le foie et se fixe et active le récepteur de FGF 4 (FGFR4) en complexe avec le  $\beta$ -Klotho localisés sur la surface des hépatocytes <sup>224,225</sup>. L'activation du complexe FGFR4/ $\beta$ -Klotho stimule la voie c-Jun N-terminal kinases (JNK), inhibant l'expression de CYP7A1 <sup>226,227</sup>. Ces effets ne sont pas observés chez les souris SHP-KO ce qui suggère que SHP est nécessaire pour les effets suppresseurs de FGF15/19 <sup>226</sup>. L'activation de FXR $\alpha$  au niveau intestinal par les acides biliaires peut ainsi réguler négativement l'expression de CYP7A1 de façon indirecte via FGF15/19 intestinal.



**Figure 22 : La régulation de la synthèse des AB par la répression de CYP7A1 est médiée par les voies de signalisation de FXR $\alpha$ . La signalisation AB-FXR $\alpha$  hépatique active SHP qui contrôle négativement l'expression de CYP7A1. La signalisation AB-FXR $\alpha$  intestinale induit l'expression de FGF15/19. La sécrétion de FGF15/19 dans la veine porte suivie de sa fixation à son récepteur hépatique FGFR4/ $\beta$ Klotho aboutit à la répression hépatique de CYP7A1 et CYP8B1. D'après (<sup>228</sup>).**



## 2. Autres rôles de FXR $\alpha$

Outre le rôle bien établi de FXR $\alpha$  dans la régulation de l'homéostasie des acides biliaires, FXR $\alpha$  régule des gènes impliqués dans de nombreuses voies métaboliques distinctes comme celle des lipoprotéines et du glucose. FXR $\alpha$  régule aussi la régénération hépatique et joue un rôle protecteur dans la carcinogenèse du foie <sup>229</sup>.

Il existe d'autres rôles moins étudiés de FXR $\alpha$  qui ne semblent pas liés à son rôle de facteur de transcription. Par exemple, une étude récente a mis en évidence un rôle possible de FXR $\alpha$  dans la réparation de l'ADN <sup>230</sup>.

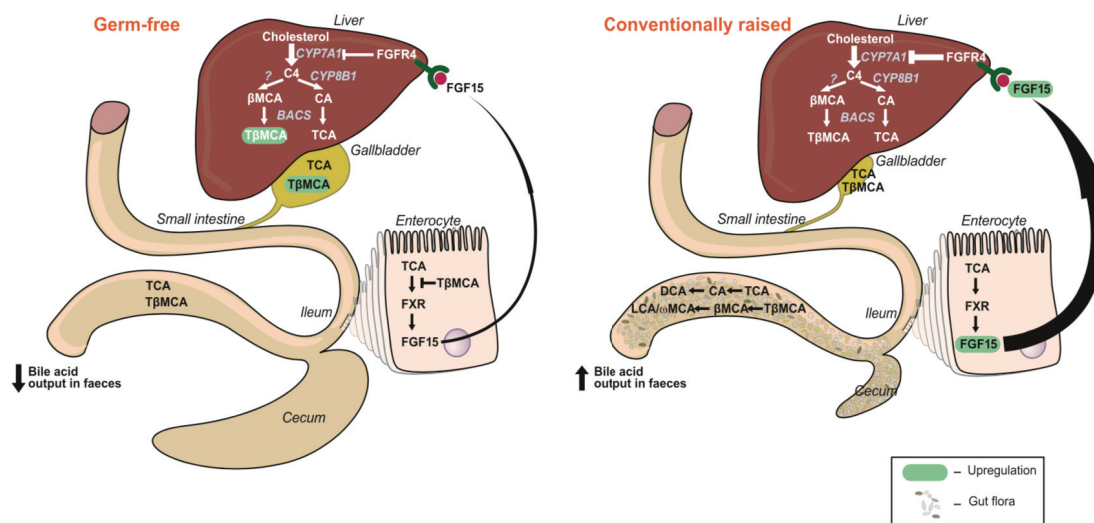
## 5. Liens entre le métabolisme des AB et la flore intestinale

Il est estimé que le tractus gastro-intestinal abrite  $10^{14}$  microorganismes vivants en symbiose avec l'hôte humain <sup>231-233</sup>. La relation symbiotique entre la flore intestinale et l'hôte débute dès la naissance <sup>231</sup>. La composition de la flore varie au cours de la vie en réponse à divers facteurs dont les effets du microbiote, les changements de développement dans l'environnement de l'intestin et la transition vers un régime alimentaire adulte <sup>232</sup>. La flore intestinale joue un rôle essentiel dans le métabolisme des acides biliaires secondaires et dans la régulation de la synthèse des acides biliaires hépatiques.

Des expériences sur des souris élevées de manière conventionnelle (« souris normales ») et des souris élevées dans un environnement stérile (« souris stériles ») ont montré l'importance de la flore dans le métabolisme des acides biliaires <sup>210</sup>. Le pool global d'acides biliaires diffère remarquablement entre les souris normales et les souris stériles dépourvues de flore intestinale. En effet, dans les souris normales, ce pool est diminué dans la vésicule biliaire et dans l'intestin grêle avec des réductions spécifiques de MCA plus que de CA <sup>234,235</sup> mais il est augmenté dans le caecum, le colon et les selles. Le pool d'acides biliaires réduit pourrait refléter une plus faible réabsorption des acides biliaires de l'iléon et une augmentation de l'excrétion des acides biliaires dans les selles. La diversité des acides biliaires est également plus importante dans le caecum, le colon et les selles des souris normales par rapport aux souris stériles. C'est dans le gros intestin que le microbiote intestinal hydrolyse les sels biliaires (déconjugaison de la taurine) puis catalyse la 7 $\alpha$ -déshydroxylation des acides biliaires par l'enzyme hydrolysant les acides biliaires (BSH) aboutissant à la production d'acides biliaires secondaires <sup>236,237</sup>. L'acide tauro- $\beta$ -muricholique (T $\beta$ MCA) est l'acide biliaire majoritaire chez les rongeurs et agit comme un antagoniste compétitif et réversible de FXR $\alpha$  <sup>210</sup>. Dans les souris normales, la flore intestinale déconjugue rapidement le T $\beta$ MCA en  $\beta$ MCA et module ainsi l'expression de FXR $\alpha$  dans l'intestin.

La flore intestinale contrôle négativement l'expression de CYP7A1 et la synthèse d'acides biliaires en diminuant le niveau de TMCAs et en augmentant l'expression de FGF15 dans l'iléon à travers une voie dépendante de FXR $\alpha$ . **(Figure 23)**.

Un équilibre dynamique existe entre le régime alimentaire et la taille et composition du pool d'acide biliaire du microbiote intestinal et les perturbations de cet équilibre pourraient favoriser l'apparition de pathologies.



**Figure 23 : Impact de la flore intestinale sur le pool d'acides biliaires.** Les souris stériles ont un pool d'acides biliaires plus large comparé aux souris normales. L'activité et l'expression de CYP7A1 et les niveaux de TβMCA sont augmentés dans les souris stériles alors que l'expression et l'activité de CYP8B1 et les niveaux de CA sont similaires dans les souris stériles et normales. Dans les souris normales, la réduction de TβMCA aboutit à l'augmentation de l'activation de FXRα dans les entérocytes qui augmente l'expression de FGF15, un suppresseur potentiel de CYP7A1. La présence de la flore intestinale chez les souris conventionnelles cause une variation du profil d'acides biliaires dû à la présence d'acides biliaires secondaires ainsi qu'une augmentation d'excrétion d'acides biliaires. D'après (210).

## 6. Les ligands de FXRα

### a. Les ligands naturels et synthétiques de FXRα

Les stéroïdes sont les ligands majeurs de FXRα. La puissance des acides biliaires pour activer FXRα décroît dans cet ordre : CDCA > DCA > LCA > CA <sup>208</sup>. De nombreux composés, non reliés aux acides biliaires, peuvent agir comme ligands de FXRα comme les androstérones <sup>238</sup>, la stérolforskolin qui est un produit naturel exogène <sup>239</sup>, le stigmasterol <sup>240</sup> et la guggulstérone <sup>241</sup>. Une série de dérivés d'acides biliaires synthétiques ont été développés comme ligands synthétiques de FXRα tel que l'acide 6α-éthyl-chénodésoxycholique (6-ECDC) et les alcools biliaires montrant une affinité encore plus importante que les acides biliaires <sup>242</sup>.

Le GW4064 ou le 3-(2,6-dichlorophenyl)-4-(3'-carboxy-2-chlorostilben-4-yl)oxymethyl-5-isopropylisoxazole est le premier agoniste synthétique de forte affinité sélectif de FXRα développé par Maloney *et al.* dans les années 2000 par criblage à haut-débit et chimie combinatoire <sup>243</sup>. L'analyse pharmacocinétique chez le rat a montré que le GW4064 a une faible biodisponibilité par voie orale d'environ 10% avec un temps de demi-vie de 3 heures et demie. Le GW4064 active FXRα humain et murin avec des valeurs de concentrations efficaces médianes EC50 de 80 et de 90 nM, respectivement. Le GW4064 est ainsi 1000 fois plus puissant que le CDCA pour activer FXRα <sup>244</sup>. Cet agoniste de FXRα induit aussi l'expression des ARNm de OSTα et OSTβ dans l'intestin.

L'expression d'OST $\alpha$  et OST $\beta$  dans des HepG2 facilite l'absorption du CDCA-conjugué et l'activation des gènes cibles de FXR $\alpha$ .

Les acides muricholiques sont beaucoup moins hydrophobes que les acides biliaires primaires (l'acide chénodésoxycholique et l'acide cholique) qui présentent une affinité à FXR $\alpha$  directement liée à leur hydrophobicité <sup>245</sup>. À l'opposé du 6-ECDCa, l'acide tauro- $\beta$ -muricholique n'occupe pas le site près de la Tyr358, Phe363 et Tyr366 dans la poche de fixation du ligand connu pour être critique pour l'activation de FXR $\alpha$ . Ceci expliquerait son activité antagoniste <sup>210,246</sup>. T $\alpha$ MCA et T $\beta$ MCA sont des antagonistes de FXR $\alpha$  à des IC<sub>50</sub> respectifs de 28 et 40 $\mu$ M. La conjugaison de la taurine est essentielle à l'activité antagoniste.

### **b. Les applications cliniques des agonistes de FXR $\alpha$**

Depuis plus de 3000 ans, la bile de l'ours a été utilisée en médecine traditionnelle chinoise pour traiter diverses affections. Dans la majorité des cas, la bile est obtenue à partir d'expérimentation sur des ours vivants, logés dans d'étroites cages, dans des conditions contraires à l'éthique et malheureusement la pratique de la distribution de leur bile continue bien qu'elle soit illégale dans de nombreux pays dont la France.

En médecine occidentale, l'administration par voie orale d'acides biliaires (CDCA et UDCA) purs et chimiquement synthétisés n'a été utilisée que depuis quatre décennies. L'UDCA n'est pas un agoniste de FXR $\alpha$  et est toujours utilisé en clinique en cas de cholestase. Des essais cliniques de phase I, II et III ont été entrepris en utilisant des agonistes de FXR $\alpha$ . Le INT-747 (6-ECDCa ; l'acide obéticholique), le FXR-450 et le PX-102 <sup>247</sup>. Aucun effet néfaste n'a été signalé sauf la majoration du prurit causé par l'acide obéticholique. Des essais cliniques à plus grande échelle sont nécessaires pour déterminer si les agonistes spécifiques de FXR $\alpha$  s'avèrent utiles dans le traitement du diabète de type 2, du syndrome métabolique, de la stéatohépatite non-alcoolique (NASH) et de la cirrhose biliaire primitive.

## **7. Liens entre le VHB et le métabolisme des acides biliaires**

### **a. Régulation de la transcription du génome viral par les récepteurs nucléaires**

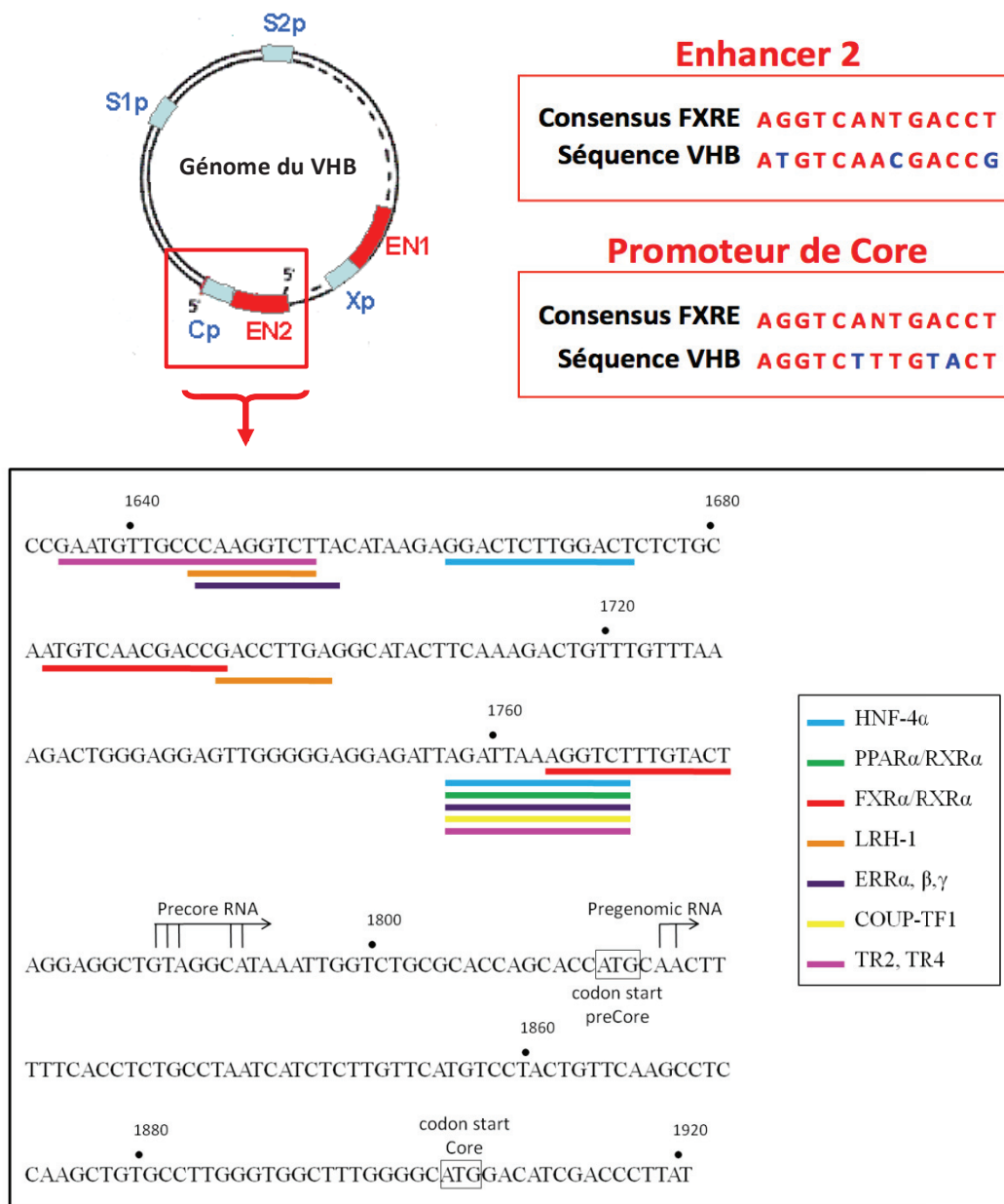
Le rôle des récepteurs nucléaires dans la régulation du VHB a été montré par des études *in vitro* dans des lignées cellulaires d'hépatocarcinome et des lignées d'origine non-hépatique après transfection du génome du VHB. Les études *in vivo*, sont quant à elles peu nombreuses et dépendent principalement des souris transgéniques pour le génome du VHB où une copie du génome du VHB d'une taille 1,3 fois plus longue (1.3xVHB) a été intégrée dans le génome de la cellule hôte. Ces souris expriment toutes les protéines du VHB et produisent des virions infectieux. Cependant, il n'y a pas de cccDNA formé impliquant que la régulation de la transcription du VHB puisse significativement différer du cccDNA épisomal original <sup>248</sup>. Ces modèles ont permis d'établir un rôle physiologique de l'hétérodimère PPAR $\alpha$ /RXR $\alpha$  dans la transcription du VHB mais à l'opposé n'ont pu confirmer le rôle de HNF1 dans le contrôle de l'expression de l'AgHBs.

Plusieurs facteurs nucléaires, PPAR $\alpha$ , HNF4 $\alpha$  et FXR $\alpha$  peuvent se fixer sur plusieurs séquences cibles dans les régions promotrices et Enhancer et avoir des effets différents sur l'expression des différents gènes viraux <sup>249</sup>. Par exemple, trois séquences cibles ont été identifiés pour l'hétérodimère PPAR $\alpha$ /RXR $\alpha$  dans les régions promotrices de Core et

de preS1 et dans la région Enhancer 1. La surexpression de PPAR $\alpha$ /RXR $\alpha$  dans les cellules Huh7 stimule l'expression de l'ARNpg mais pas celui de l'ARNpreC. De manière similaire, HNF4 $\alpha$  qui se fixe aussi sur ses éléments de réponse dans la région promotrice de Core et dans les régions Enhancer 1 et Enhancer 2, inhibe l'expression de l'ARNpreC mais augmente de manière significative la synthèse de l'ARNpg. L'activité de ces facteurs est régulée par des modifications post-traductionnelles, par des co-activateurs ou par des inhibiteurs.

#### **b. Identification de séquences FXRE sur le génome viral**

L'équipe a montré en 2008 que FXR $\alpha$  se fixe sous forme de monomère ou d'hétérodimère avec RXR $\alpha$  (FXR $\alpha$ /RXR $\alpha$ ) sur deux séquences du génome viral qui apparaissent donc comme des éléments de reconnaissances à FXR $\alpha$  (FXRE). L'un est présent dans le promoteur de Core et chevauche les éléments de réponses de PPAR $\alpha$ , HNF4, COUP-TF, C/EBP et TR2-4 et l'autre dans la région Enhancer 2 <sup>250</sup> (**Figure 24**).



**Figure 24 : Identification de deux séquences consensus FXRE dans la région Enhancer 2 – Promoteur de Core du génome du VHB. Adapté de (251).**

L'expression ectopique de FXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  dans des cellules d'origine non-hépatique est suffisante pour induire l'expression des ARNm de 3,5 kb et la réplication du VHB après transfections d'un vecteur 1.3xVHB<sup>250,252</sup>. Le traitement par des agonistes de FXR $\alpha$  stimule de façon accrue l'activité du promoteur Core. De manière intéressante, les agonistes de FXR $\alpha$  stimulent préférentiellement la synthèse de l'ARNpg que l'ARNpreC<sup>250</sup>. Il a été montré, dans un modèle de souris transgéniques pour le génome du VHB, que le traitement avec l'acide cholique augmentait la sécrétion de l'AgHBe et la transcription des ARNs de 3,5 kb par un facteur de 2 avec des variations entre mâle et femelle<sup>253</sup>. Ces variations étaient du même ordre que celles obtenues sur l'induction par l'acide cholique de l'expression des gènes cellulaires cibles de FXR $\alpha$ , BSEP et SHP.

### c. Compétition entre les acides biliaires et le VHB pour NTCP

De manière intéressante, le principal transporteur d'acides biliaires NTCP a récemment été identifié comme récepteur d'entrée du VHB<sup>43</sup>. La compétition entre l'AgHBs et les acides biliaires pour NTCP<sup>254,255</sup> pourrait expliquer l'augmentation de l'expression intra-hépatique des ARNm de FXR $\alpha$ , APOA1 et CYP7A1 et la diminution d'expression de l'ARNm de SHP chez les individus infectés par le VHB qui sont compatibles avec un plus faible niveau d'activation de FXR $\alpha$  par les acides biliaires endogènes<sup>256</sup>.

### d. Interaction FXR $\alpha$ -HBx-Sirt1

La sirtuine 1 (SIRT1) est une histone désacétylase qui cible directement FXR $\alpha$  en désacétylant principalement sa lysine 217. L'acétylation de FXR $\alpha$  augmente sa stabilité et inhibe son hétérodimérisation avec RXR $\alpha$ , la fixation à l'ADN et son activité transactivatrice<sup>257</sup>. La présence de SIRT1 sur le cccDNA est associée à une faible réplication du VHB dans les lignées cellulaires d'hépatocarcinome<sup>258</sup>. L'équipe a précédemment montré qu'un réseau de protéines cellulaires incluant FXR $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$  (co-activateur de plusieurs facteurs de transcriptions) et SIRT1, tous impliqués dans la régulation métabolique, pouvaient moduler de manière interdépendante l'activité de la région Enh2Cp<sup>252</sup>. Des études ultérieures ont montré que l'activation de SIRT1 par le resveratrol ou son inhibition par la nicotinamide favorise ou réprime, respectivement, la réplication du VHB, au moins partiellement de manière dépendante de PGC1-1 $\alpha$ <sup>259,260</sup>. De manière intéressante HBx se fixe directement sur SIRT1 et altère sa fonction<sup>261</sup>. Une interaction directe entre la troisième hélice  $\alpha$  de HBx et le domaine AF1 de FXR $\alpha$  a déjà été décrite<sup>262</sup> sans savoir si cette interaction a des conséquences sur le cycle de réplication du virus.

### e. Conséquences de l'infection par le VHB sur FXR $\alpha$

Les conséquences fonctionnelles de l'infection par le VHB sur l'activité de FXR $\alpha$  et les modifications du profil des gènes dépendants de FXR $\alpha$  a été montré par une étude *ex vivo* sur des biopsies de foies de patients infectés<sup>256</sup>. L'infection par le VHB augmente l'expression de FXR $\alpha$  mais semble le maintenir dans un état de faible niveau d'activité permettant ainsi la transcription des gènes, directement ou indirectement, négativement régulés par FXR $\alpha$ . Cependant l'impact de cette interaction sur le cycle viral n'a pas été étudié ou rapporté.

# **HYPOTHÈSES ET CHOIX DES MODÈLES**



## I. Hypothèses

Ce projet s'appuie sur l'existence avérée de liens étroits entre l'infection par le VHB et le métabolisme des AB. Cette voie métabolique est régulée par un réseau complexe d'hormones, de transporteurs membranaires, de facteurs de transcription et par la flore bactérienne digestive. Le microbiote intestinal métabolise les AB, contrôle leur pool et leur diversité. La synthèse des AB est également régulée par une boucle de rétrocontrôle impliquant l'expression et l'activité de FXR $\alpha$  au niveau hépatique et intestinal. NTCP, le principal transporteur des AB a été identifié comme le récepteur hépatique du VHB. Notre équipe a par ailleurs montré que FXR $\alpha$  se fixait sur le promoteur de core du génome du VHB et modulait son activité. Microbiote intestinal et AB évoluent de façon interdépendante au cours des premières années de vie et la perturbation du microbiote modifie l'activité de FXR $\alpha$  et le métabolisme des AB. De façon intéressante, il a été observé que l'injection hydrodynamique de VHB dans des souris C3H/HeN entraînait une infection chronique chez les souriceaux et les adultes après traitement antibiotique, mais pas chez les souris adultes non traitées. À partir de ces observations, notre objectif a été l'étude des interactions entre le VHB et FXR $\alpha$  et l'étude du mécanisme d'action de FXR $\alpha$  sur l'infection par le VHB.

Dans un premier temps, nous avons cherché à investiguer l'interdépendance entre le métabolisme des acides biliaires et l'infection par le virus de l'hépatite B. Pour cela, dans une première étude, nous avons exploré les effets de l'infection du VHB sur le métabolisme des AB et réciproquement ceux de la modulation de FXR $\alpha$  par ses ligands sur la réplication du VHB. Dans un deuxième temps, nous avons tenté de déterminer les mécanismes par lesquels FXR $\alpha$  et sa modulation par ses ligands module l'infection par le VHB. Afin de répondre à nos questions nous avons eu recours à des modèles *in vitro* et *in vivo*.

## II. Modèles d'études

### 1. Modèles *in vitro*

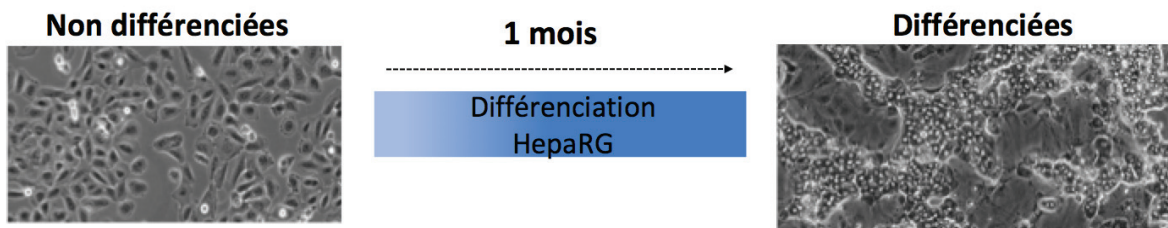
Nous avons utilisé des hépatocytes primaires humains et des cellules HepaRG différenciées comme modèles *in vitro*, car considérés comme les plus pertinents pour l'étude du rôle de FXR $\alpha$  dans le cycle de vie du VHB.

#### a. Les hépatocytes primaires humains (HPH)

Les hépatocytes primaires humains (HPH) sont le modèle de référence pour l'étude de la réplication du VHB *in vitro* où le taux d'infection peut atteindre les 100% dans certaines conditions <sup>263</sup>. Ce modèle utilisé depuis les années 1986 <sup>264</sup> n'est devenu pratique pour des études systémiques qu'après optimisation des conditions de culture par l'ajout de DMSO dans le milieu de culture et du polyéthylène glycol (PEG) pour augmenter l'efficacité d'infection <sup>265</sup>. Ces cellules étaient pendant longtemps le seul système pour étudier le cycle complet de réplication du VHB car les lignées cellulaires hépatiques immortalisées communément utilisées comme les Huh7 et les HepG2 ne supportent pas l'infection par le VHB.

## b. Les HepaRG différenciées (dHepaRG)

La découverte des HepaRG, une lignée de cellules hépatiques humaines immortalisées mais non transformées a permis de surmonter certaines limitations d'étude du VHB. Cette lignée isolée à partir d'un patient atteint d'un carcinome hépatocellulaire, une tumeur d'Edmonson de grade 1 développée suite à une hépatite C chronique, se comporte comme des cellules progénitrices du foie qui ont le potentiel de se différencier en cellules granulaires hépatocytaires et en cellules biliaires après un traitement au DMSO <sup>256</sup> (**Figure 25**).



**Figure 25 : Différenciation des HepaRG.** À gauche, des cellules HepaRG en cours phase de croissance ne pouvant être infectées par le VHB. À droite des cellules différenciées en deux populations de cellules biliaires et de cellules granulaires hépatocytaires infectables par le VHB. Images microscopiques tirées de (<sup>267</sup>).

Ces cellules sont infectables par le VHB et le VHD mais l'efficacité de l'infection *in vitro* reste faible pour le VHB et nécessite un inoculum important (100 génome équivalent VHB par cellule). Les HepaRG conservent les fonctions spécifiques des hépatocytes tels que la sécrétion d'albumine, la formation de canalicules biliaires, les activités des transporteurs de médicaments, l'expression du cytochrome P450, de la glutathion S-transférase ainsi que d'autres enzymes impliquées dans le métabolisme du médicament <sup>268</sup>. Le niveau endogène de NTCP humain (hNTCP) des HepaRG qui peut être atteint à travers la différenciation est de l'ordre de 10% comparé aux HPH. Ceci explique pourquoi cette lignée ne peut être infectée à des pourcentages comparables à ceux des HPH.

Il est à noter que dans les dHepaRG un seul cycle viral a lieu avec une incapacité des capsides néoformées à ré-augmenter le pool de cccDNA et un taux négligeable de réinfection de nouvelles cellules par les virus sécrétés.

## c. Les lignées hépatocytaires Huh7 et HepG2

Les lignées cellulaires hépatiques immortalisées communément utilisées comme les Huh7 et les HepG2 ne supportent pas l'infection par le VHB. L'identification de NTCP comme récepteur d'entrée du VHB a profondément modifié le champ des modèles d'infections. Ainsi, la surexpression de NTCP humain dans ces cellules non permissives à l'infection permet l'entrée du virus et un cycle viral complet (Huh7<sup>hNTCP</sup> et HepG2<sup>hNTCP</sup>). Cependant, les rendements d'infection restent modestes <sup>269</sup>. Ces nouveaux modèles sont désormais largement utilisés surtout dans les approches de criblage de médicaments à haut débit. Pour ce qui concerne le métabolisme des acides biliaires, ces cellules présentent des fonctions particulières très différentes de celles observées *in vitro* dans les HPH et les dHepaRG ou *in vivo* (**Cf. Discussion**).

## 2. Modèles *in vivo*

Pour confirmer nos résultats obtenus *in vitro* nous avons eu recours à un modèle de souris C3H/HeN.

### a. Les souris C3H/HeN transduits par AAV2/8-VHB

#### 1. Définition d'un AAV

Le virus adéno-associé (AAV) est un petit virus à ADN simple brin, non enveloppé, appartenant à la famille des *Parvoviridae*. Il a été adapté pour être utilisé comme véhicule de transfert de gènes. Il est capable de transduire une large gamme d'espèces et de tissus *in vivo* sans causer de toxicité et générant de très faibles réponses immunitaires innées et adaptatives.

Son génome de 4,7 kb comporte 2 ORFs principales qui sont Rep et Cap. Rep code 4 protéines régulatrices (Rep40, Rep52, Rep68 et Rep78) qui jouent un rôle important dans la réplication et l'encapsidation de l'ADN viral. Cap code 3 protéines de capsides (VP1, VP2 et VP3) et la protéine d'activation d'assemblage AAP qui favorise la formation de la capsid. Le génome est flanqué par des répétitions terminales inverses (ITR) qui comportent des séquences de reconnaissances de Rep, importants pour la réplication de l'ADN et l'assemblage de l'AAV <sup>270</sup>.

Un vecteur AAV est un variant recombinant du virus AAV sauvage, dans lequel les régions codantes et non-codantes ont été remplacé par une cassette plus petite que 4,7 kb. Ces vecteurs sont largement utilisés pour les applications de thérapie génique en raison de leur efficacité et de leur non-toxicité prouvées aussi bien lors d'essais précliniques <sup>271,272</sup> que cliniques <sup>273,274</sup>. La production de vecteurs rAAV date de plus de trente ans après que des études de 1984 aient montré la formation de particules AAV génétiquement modifiés capable d'infecter et de transduire des cellules de mammifères <sup>275,276</sup>.

#### 2. AAV2/8-VHB

Le sérotype 8 du vecteur recombinant de AAV présente la capacité d'être transduit relativement spécifiquement dans le foie <sup>277</sup>. 1,2 copie du génome du VHB (génotype D) a été clonée entre les deux séquences répétées inversées (ITRs) du sérotype 2 de AAV dans un vecteur plasmide qui a par la suite été utilisé pour produire le vecteur recombinant AAV2/8-VHB <sup>278</sup>. Les marqueurs viraux du VHB (sauf pour le cccDNA) ont été observés chez les souris HLA-A2/DR1 injectées avec le AAV2/8-VHB.

#### 3. Les souris C3H/HeN

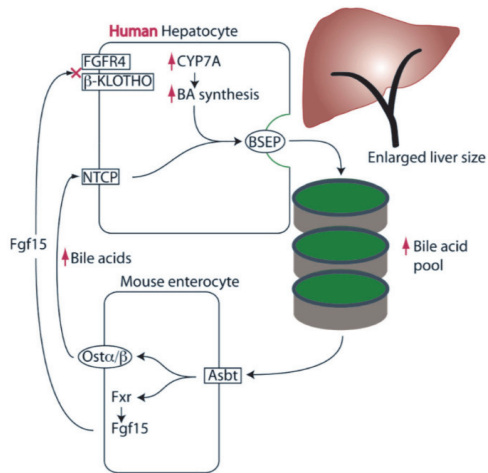
Les souris C3H/HeN sont des homozygotes pour l'allèle Pde6b<sup>rd1</sup> responsable d'une dégénérescence rétinienne qui provoque la cécité au moment du sevrage. Il a montré que génome du VHB peut être introduit dans le foie de souris par transduction de vecteurs viraux comme un adénovirus ou des vecteurs AAV contenant l'ADN du VHB <sup>279,280</sup>. La transduction du génome du VHB dans les souris à partir de vecteurs viraux aboutit à une expression efficace du génome viral dans le foie et de la réponse immunitaire contre le VHB. Cependant, la réponse immunitaire induite par les vecteurs viraux, comme par exemple l'induction de l'interféron de type I, peut interférer avec la réponse immunitaire de l'hôte contre le VHB.

Les souris C3H/HeN sont un modèle d'infection du VHB dans lequel l'établissement de la flore intestinale influence de manière significative les réponses immunitaires hépatiques qui aboutissent à la persistance ou à la clairance virale selon l'âge <sup>281</sup>. En effet, l'injection hydrodynamique du plasmide pAAV/HBV1.2 (génotype A) dans les souris C3H/HeN aboutit à une infection chronique chez 80% des souris jeunes alors que les souris adultes résolvent l'infection à la 5<sup>ème</sup> semaine. Une grande différence existe dans la diversité du microbiote intestinale entre les souris C3H/HeN jeunes et adultes. Entre la 6<sup>ème</sup> et la 9<sup>ème</sup> semaine, la flore intestinale des souris C3H/HeN s'établit vers un équilibre. Ce processus joue un rôle crucial dans le développement de l'immunité du foie. Uniquement 47% des souris adultes C3H/HeN ayant subi une stérilisation de l'intestin par traitement à l'antibiotique ont résolu l'infection en 6 mois. De plus, alors que toutes les souris adultes non traitées ont développé des anticorps anti-HBs, uniquement 6 des 9 souris adultes traitées à l'antibiotique et ayant résolu l'infection, ont développé des anticorps anti-HBs.

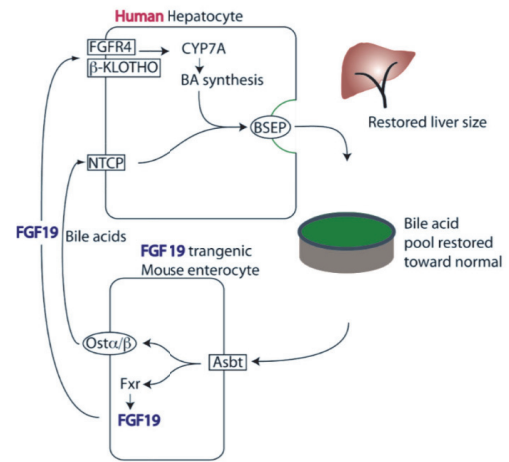
#### **b. Les souris à foie humanisé : un modèle d'étude imparfait pour l'étude de la modulation de la réplication du VHB par FXR $\alpha$**

Les souris chimériques humanisées représentent un modèle prometteur pour l'étude du VHB *in vivo*. Le principe repose sur la transplantation de cellules permissives au VHB dans des souris hôtes (souris uPA, souris trimera, souris SCID, souris FRG) <sup>282</sup>. Cependant, chez les souris à foie humanisé, le métabolisme des acides biliaires et l'activité de FXR $\alpha$  sont fortement dérégulés dû à l'absence de signalisation de FGF19 et à l'impossibilité par le foie humain de reconnaître FGF15. Cela engendre un élargissement du pool d'acides biliaires et par conséquent une augmentation de la masse hépatocytaire. En effet, la taille du foie est en partie régulée par la taille du pool d'acides biliaires que le foie doit faire circuler (**Figure 26 A**). Aussi, dans les souris à foie humanisé, l'enzyme limitante de la synthèse d'acides biliaires, CYP7A1 est fortement surexprimé dans les hépatocytes humains <sup>283</sup>. L'expression de FGF19 transgénique peut corriger la signalisation défectueuse des acides biliaires (**Figure 26 B**) résultant de la normalisation de la synthèse d'acides biliaires, du pool d'acides biliaires, et de la taille du foie <sup>284</sup>.

**A) Aberrant bile acid signaling results in enlarged bile acid pool and liver**



**B) Corrected bile acid signaling restores bile acid pool and liver size**



**Figure 26 : Régulation non physiologique du pool d'acides biliaires et de la taille du foie chez les souris à foie humanisé.** A) L'absence de signalisation de la voie FGF15 perturbe l'homéostasie des acides biliaires chez la souris à foie humanisé dû à l'impossibilité de reconnaître FGF15 par le foie humain. Cela aboutit à un élargissement du pool d'acides biliaires et à par conséquent à une augmentation de la masse hépatocytaire nécessaire à faire circuler le pool. B) L'introduction de FGF19 permet aux hépatocytes humains transplantés de réguler proprement la synthèse d'acide biliaire avec un retour à la normale du pool d'acide biliaire et d'une décroissance de la masse hépatocytaire. D'après (284).

# TRAVAUX RÉALISÉS

## I. Première étude

**La régulation réciproque de l'activité du farnesoid X receptor  $\alpha$  et de la réplication du virus de l'hépatite B dans les cellules HepaRG différenciées et les hépatocytes primaires humains.**

Pauline Radreau, Marine Porcherot, Christophe Ramière, Karim Mouzannar, Vincent Lotteau, Patrice André.

Article publié dans *The FASEB Journal*, 2016.



# Reciprocal regulation of farnesoid X receptor $\alpha$ activity and hepatitis B virus replication in differentiated HepaRG cells and primary human hepatocytes

Pauline Radreau,<sup>\*,†,‡,§,1</sup> Marine Porcherot,<sup>\*,†,‡,§,1</sup> Christophe Ramière,<sup>\*,†,‡,§,¶</sup> Karim Mouzannar,<sup>\*,†,‡,§</sup>  
Vincent Lotteau,<sup>\*,†,‡,§,2</sup> and Patrice André<sup>\*,†,‡,§,¶,2,3</sup>

\*Centre International de Recherche en Infectiologie, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 1111, Centre National de la Recherche Scientifique Unités Mixte de Recherche 5308, Lyon, France; <sup>†</sup>Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France; <sup>‡</sup>Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France; <sup>§</sup>Université de Lyon, Lyon, France; and <sup>¶</sup>Laboratoire de Virologie, Hôpital de la Croix-Rousse, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

**ABSTRACT:** Hepatitis B virus (HBV) and bile salt metabolism seem tightly connected. HBV enters hepatocytes by binding to sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP), the genome of which contains 2 active farnesoid X receptor (FXR)  $\alpha$  response elements that participate in HBV transcriptional activity. We investigated in differentiated HepaRG cells and in primary human hepatocytes (PHHs) effects of FXR activation on HBV replication and of infection on the FXR pathway. In HepaRG cells, FXR agonists (6-ethyl chenodeoxycholic acid and GW4064), but no antagonist, and an FXR-unrelated bile salt inhibited viral mRNA, DNA, and protein production (IC<sub>50</sub>, 0.1–0.5  $\mu$ M) and reduced covalently closed circular DNA pool size. These effects were independent of the NTCP inhibitor cyclosporine-A, which suggests inhibition occurred at a postentry step. Similar results were obtained in PHHs with GW4064. Infection of these cells increased expression of FXR and modified expression of FXR-regulated genes *SHP*, *APOA1*, *NTCP*, *CYP7A1*, and *CYP8B1* with a more pronounced effect in PHHs than in HepaRG cells. FXR agonists reversed all but one of the HBV-induced FXR gene profile modifications. HBV replication and FXR regulation seem to be interdependent, and altered bile salt metabolism homeostasis might contribute to the persistence of HBV infection.—Radreau, P., Porcherot, M., Ramière, C., Mouzannar, K., Lotteau, V., André, P. Reciprocal regulation of farnesoid X receptor  $\alpha$  activity and hepatitis B virus replication in differentiated HepaRG cells and primary human hepatocytes. *FASEB J.* 30, 3146–3154 (2016). www.fasebj.org

**KEY WORDS:** cccDNA · bile salt · nuclear receptor · FXR agonist

Hepatitis B remains a public health problem despite an efficient and safe vaccine, with one third of the world population already infected by hepatitis B virus (HBV) and 240 million chronically infected individuals with the inherent risk of progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma (1). The natural history of HBV infection varies

widely depending on age of infection. In most cases, HBV infection becomes chronic in children and newborns, whereas it remains self-limited in adults, evolving to a state of functional cure characterized by virus clearance from plasma and HBe and HBs seroconversions; however, for a minority of adults, primary infection persists with continuous replication of the virus in the liver and sustained viremia. For these patients, current treatments with pegylated IFNs or with nucleotide analogs generally fail to induce a sustained virological response, defined by off-treatment suppression of viral replication, loss of plasma HBe and HBs proteins, and undetectable HBV DNA (2). A better understanding of the cellular status that favors persistence of viral replication in chronically infected patients, either preexisting or induced by the virus, should lead to original therapeutic strategies to restore the physiologic conditions that predominate in the majority of patients with self-limited disease.

Hepatitis B virions enter hepatocytes by following HBs that bind to heparan sulfate proteoglycans and to the sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP), a

**ABBREVIATIONS:** 6ECDCA, 6-ethyl chenodeoxycholic acid; cccDNA, covalently closed circular DNA; CyA, cyclosporine A; dHepaRG, differentiated HepaRG; EnhII/Cp, enhancer II/core promoter region; FXR, farnesoid X receptor; GFP, green fluorescent protein; HBV, hepatitis B virus; HEK 293T, human embryonic kidney 293T; LAM, lamivudine; NTCP, sodium taurocholate cotransporting polypeptide; PHH, primary human hepatocyte; Tak, FXR inhibitor CAS936123-05-6; UDCA, ursodeoxycholic acid

<sup>1</sup> Current affiliation: EnyoPharma, Lyon, France.

<sup>2</sup> These authors contributed equally to this work.

<sup>3</sup> Correspondence: Centre International de Recherche en Infectiologie, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1111, 21 Avenue Tony Garnier, 69007 Lyon, France. E-mail: patrice.andre@inserm.fr

doi: 10.1096/fj.201500134

This article includes supplemental data. Please visit <http://www.fasebj.org> to obtain this information.

bile salt transporter expressed at the basolateral membrane of hepatocytes (3, 4). After entry, viral capsids migrate to nuclear pores where the genome is released into the nucleus (5). The circular, partially double-stranded DNA viral genome is then completed and closed to form the covalently closed circular DNA (cccDNA) that associates with histones and other cellular and viral proteins—predominantly the core protein HBc and the multifunctional HBx protein (6, 7). The resulting cccDNA complex is organized into minichromosomes that persist in the nuclei and are transmitted to daughter cells when hepatocytes divide (8, 9). Thus, cccDNA is the molecular complex responsible for the persistence, latency, and reactivation of the virus. cccDNA contains 4 promoters and 2 enhancers that regulate its transcription and synthesis of viral mRNA, including the pregenomic RNA (10). Several binding sites for ubiquitous and liver-specific nuclear receptors and transcription factors are located in these *cis*-regulating regions (11). Regarding liver-restricted nuclear receptors, we previously identified 2 response elements for the farnesoid X receptor (FXR)  $\alpha$  (nuclear bile acid receptor) located within the enhancer II/core promoter region (EnhII/Cp) (12). Expression by transfection of FXR in cells of nonhepatic origin is sufficient to allow transcription and expression of viral RNAs upon activation by bile acids or synthetic FXR agonists. Moreover, peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator (PGC)-1 $\alpha$  and sirtuin 1 (SIRT1), 2 key metabolic sensors, form with FXR a network of proteins that regulate transcriptional activity of the HBV EnhII/Cp region in an FXR-dependent manner (13). Of interest, PGC-1 $\alpha$  modulates HBV replication *via* nutritional stimuli, which suggests that the cell metabolic environment controls HBV infection (14, 15).

HBsAg and hepatitis B virions compete with bile salts to bind NTCP, and this competition likely limits NTCP functions leading to modifications of bile salts internalization and intracellular concentrations (16). Indeed, quantification of FXR expression and other genes under its control in HBV-infected liver biopsies in chronically infected patients or in liver of humanized mouse model showed that infection is associated with down-regulation of FXR activity, with ensuing modifications of expression of FXR-regulated genes, including its own overexpression that results from inhibition of the negative feedback exerted by activated FXR, the overexpression of APOA1, and decreased expression of SHP, 2 paradigm genes that are negatively and positively, respectively, controlled by FXR (17). HBV infection thus seems to be characterized by important modifications of bile acid metabolism and of FXR expression and activity. This intimate link between bile acid metabolism and HBV replication suggests that a particular bile acid metabolic status may generate a favorable cellular environment for HBV replication.

The aim of this study was to further investigate the interplay between the bile acid metabolism pathway and HBV replication. We therefore tested the effect of various FXR ligands on HBV replication in differentiated HepaRG (dHepaRG) cells as well as in primary human hepatocytes (PHHs), and conversely, the effect of HBV infection on

FXR expression and activity. We found that FXR agonists, but not antagonists or FXR-irrelevant bile acids, have a strong inhibitory effect on HBV mRNA, DNA, and protein synthesis. We also showed that HBV infection modifies the expression profile of FXR and genes under its regulation, and that FXR agonists, at least in part, reverse virus-induced modifications of FXR-dependent gene expression profile.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

FXR agonist GW4064 was purchased from Sigma-Aldrich (Lyon, France), and 6-ethyl chenodeoxycholic acid (6ECDCA) from Metabrain Research (Chilly Mazarin, France). Bile acid ursodeoxycholic acid (UDCA) was obtained from Sigma-Aldrich, cyclosporine-A (CyA) from CliniScience (Nanterre, France), and Poly(I:C)-LMW and Poly(I:C)-HMW (tlrl-picw and vac-pic, respectively) from InvivoGen (San Diego, CA, USA). FXR inhibitor CAS936123-05-6, herein referred to as Tak (described in patent WO 2007052843 A1 20070510; Takeda Pharmaceuticals, Osaka, Japan), was synthesized by Edelris, Lyon, France.

### Cell culture

HepaRG cells were cultured in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C, in William's E medium (Thermo Fisher Scientific Life Sciences, Waltham, MA, USA) that was supplemented with 10% v/v HyClone FetalClone II serum (Thermo Fisher Scientific Life Sciences), 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine, 1% v/v insulin-transferrin-selenium, 20  $\mu$ g/ml gentamicin (Thermo Fisher Scientific Life Sciences), and 50  $\mu$ M hydrocortisone hemisuccinate (Sigma-Aldrich). Cell differentiation was carried out as previously described (18, 19). Cells were seeded in 6-well plates and maintained for 2 wk in growth medium (proliferation phase). Cells were then cultured for an additional 2 wk in medium that was supplemented with 1.8% v/v DMSO (Sigma-Aldrich) and 5 ng/ml epidermal growth factor (Roche, Meylan, France). All experiments were carried out with cells grown on collagen I-coated plates (BD BioCoat; Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France).

Freshly plated PHHs were obtained from Human HepCell (Paris, France). Upon arrival, cells were placed in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C, in William's medium that was supplemented with 2% v/v HyClone FetalClone II serum, 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine, 1% v/v insulin-transferrin-selenium, 20  $\mu$ g/ml gentamicin (Thermo Fisher Scientific Life Sciences), 50  $\mu$ M hydrocortisone hemisuccinate, and 1.8% v/v DMSO (Sigma-Aldrich).

Human embryonic kidney 293T (HEK 293T) cells were cultured in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C, in DMEM (Thermo Fisher Scientific Life Sciences) that was supplemented with 10% v/v FCS (Dutscher, Brumath, France), 100 U/ml penicillin, and 100  $\mu$ g/ml streptomycin (Thermo Fisher Scientific Life Sciences).

### HBV infection

HBV inoculum was prepared from stably transfected HepG2.2.15 cell line (20) as previously described (18). Cell inoculation was performed with 100 genome-equivalent per cell in culture medium that contained 4% v/v PEG 8000 (Sigma-Aldrich) for 24 h at 37°C. After HBV infection, cells were washed and maintained in adequate culture medium during all treatments.

For PHHs and innate immunity-related experiments, infection was carried out in a lower volume (700  $\mu$ l/well of a 6-well plate) of medium that contained only 2% v/v HyClone FetalClone II for 4 h. Extra PEG-containing medium was then added for 20 h.

## HBs and HBe antigens

HBs and HBe antigens secreted into cell supernatants were quantified by using HBsAgII and HBeAg kits, after dilutions when needed, on the Architect apparatus (Abbott Diagnostics, Rungis, France).

## Analysis of viral DNA

Secreted DNA was extracted from cell supernatant by using the easyMAG sample extraction platform following manufacturer recommendations (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Eluates were directly used for quantification of secreted viral DNA by quantitative PCR experiments using primers for rcHBV DNA: forward 5'-GGGGAGGAGATTAGGTTAAAGGTC-3', reverse 5'-CACAGCTTGGAGGCTTGAACAGTGG-3', and SYBR green master mix on a LightCycler 480 II (Roche).

Quantification of total intracellular HBV DNA, cccDNA, and rcHBV DNA was performed as previously described (21). In brief, after treatment with FXR $\alpha$  agonists, total DNA from HepaRG cells was extracted by using the MasterPure DNA purification kit (Epicentre, Madison, WI, USA). A 5- $\mu$ g DNA aliquot from each sample was treated with Plasmid-Safe ATP-dependent DNase before quantitative PCR experiments were carried out. LightCycler  $\beta$ -globin control kit DNA (Roche) was used for normalization.

## Analysis of viral and cellular RNA

Total RNA was isolated from HepaRG cells by using RNeasy mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to manufacturer instructions. After DNA digestion with Ambion Turbo DNase (Thermo Fisher Scientific Life Sciences), 500 ng RNA was reverse transcribed by using the High-Capacity RNA-to-cDNA kit (Thermo Fisher Scientific Life Sciences). cDNAs were then subjected to 45 PCR cycles with FastStart Universal SYBR green PCR master mix (Roche) using a LightCycler 480 II. The following primers were used for Preg/Precore: forward 5'-CTTTTCACC-TCTGCCTAATCATC-3', reverse 5'-CACAGCTTGGAGGCTTGAACAGTGG-3'; FXR $\alpha$  forward 5'-AGAGATGGGAATGTTGGCTGA-3', reverse 5'-GCATGCTGCTTACATTTTTT-3'; SHP forward 5'-GGCTGGCAGTGCTGATTAG-3', reverse 5'-TGGGGTGTGGCTGAGTGAAG-3' and APOA1 forward 5'-CCCAGTTGTCAAGGAGCTTT-3', reverse 5'-TGGATGTGCTCAAAGACAGC-3'; NTCP forward 5'-GGCTTTCTGCTGGGTTATGT-3', reverse 5'-CATGCTGACAGTGGCTCTG-3'; CYP7A1 forward 5'-GCTTATTCTTGAATTAGGAGAAGG-3', reverse 5'-TTGGCACCAAATTGCAGAG-3'; and CYP8B1 forward 5'-GCCTGTCTTTGTAATGCTGA-3', reverse 5'-GAAGCAAAGAGGCTGTCC-3'. Normalization was carried out by using the following 3 housekeeping genes: OAZ1 forward 5'-GGATAAACCAGCGCCAC-3', reverse 5'-TACAGCAGTGGAGGGAGACC-3'; S9 forward 5'-CCGCGTGAAGAGGAAGAATG-3', reverse 5'-TTGGCAGGAAAACAGAGACAAT-3'; and HPRT1 forward 5'-CATCACTAATCAGGACGCCAGGG-3', reverse 5'-GCGAACCTCTCGGCTTCCCG-3'. Northern blot experiments were carried out by using 3–4  $\mu$ g Turbo DNase-treated RNA separated on a 1% agarose-formaldehyde gel and transferred onto a positively charged nylon membrane. Probe was synthesized by PCR using the following primers: forward

5'-CTGAATCCTGCGGACGACCCTTCTC-3' and reverse 5'-GCCCCAAAGCCACCCAAGGCAC-3'. [<sup>32</sup>P]-Probe labeling was performed by using klenow polymerase and  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dCTP nucleotides. Quantification of HBV mRNAs was performed by using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

## Immunofluorescence

HepaRG cells were grown on collagen I-coated coverslips (BD BioCoat) and cultured as in other experiments. After various treatments, cells were fixed with 4% v/v paraformaldehyde for 30 min at room temperature and permeabilized with 0.1% v/v Triton X-100 for 10 min. All washes were made in PBS. Saturation was performed by using 4% w/v bovine serum albumin in PBS for 30 min at 37°C. Cells were stained with a rabbit polyclonal anti-HBc antibody (B0586; Dako, Trappes, France). They were visualized with Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit secondary antibody (A-11070; Thermo Fisher Scientific Life Sciences). Chromatin was stained with Hoescht to reveal nuclei. Coverslips were mounted with fluorescence mounting medium (Dako), and images were obtained by using an axio-imager Zeiss fluorescent microscope (Zeiss, Jena, Germany).

## shFXR lentiviral particle production and HepaRG transduction

HEK 293T cells ( $6 \times 10^6$ ) were transfected with jet-PEI (Polyplus Transfection, Illkirch, France) with 8  $\mu$ g p8.91 plasmid, 2.5  $\mu$ g pVSVg, and 8  $\mu$ g pPLKO.1-puro-shFXR (5'-CCGGCCTGACTGAATTACGGACATCTCGAGATGTCGGTAATTCAGTCAGGCTTTTT-3'; NM\_005123.1-1660s1c1; Sigma-Aldrich). Green fluorescent protein (GFP) control lentiviral particles were generated by transfecting p8.91, pVSVg, and PLKO.1 puro-CMV-turboGFP (Sigma-Aldrich). For both productions, medium was changed 24 h post-transfection and lentivirus particles were harvested and filtered at 96 and 120 h post-transfection.

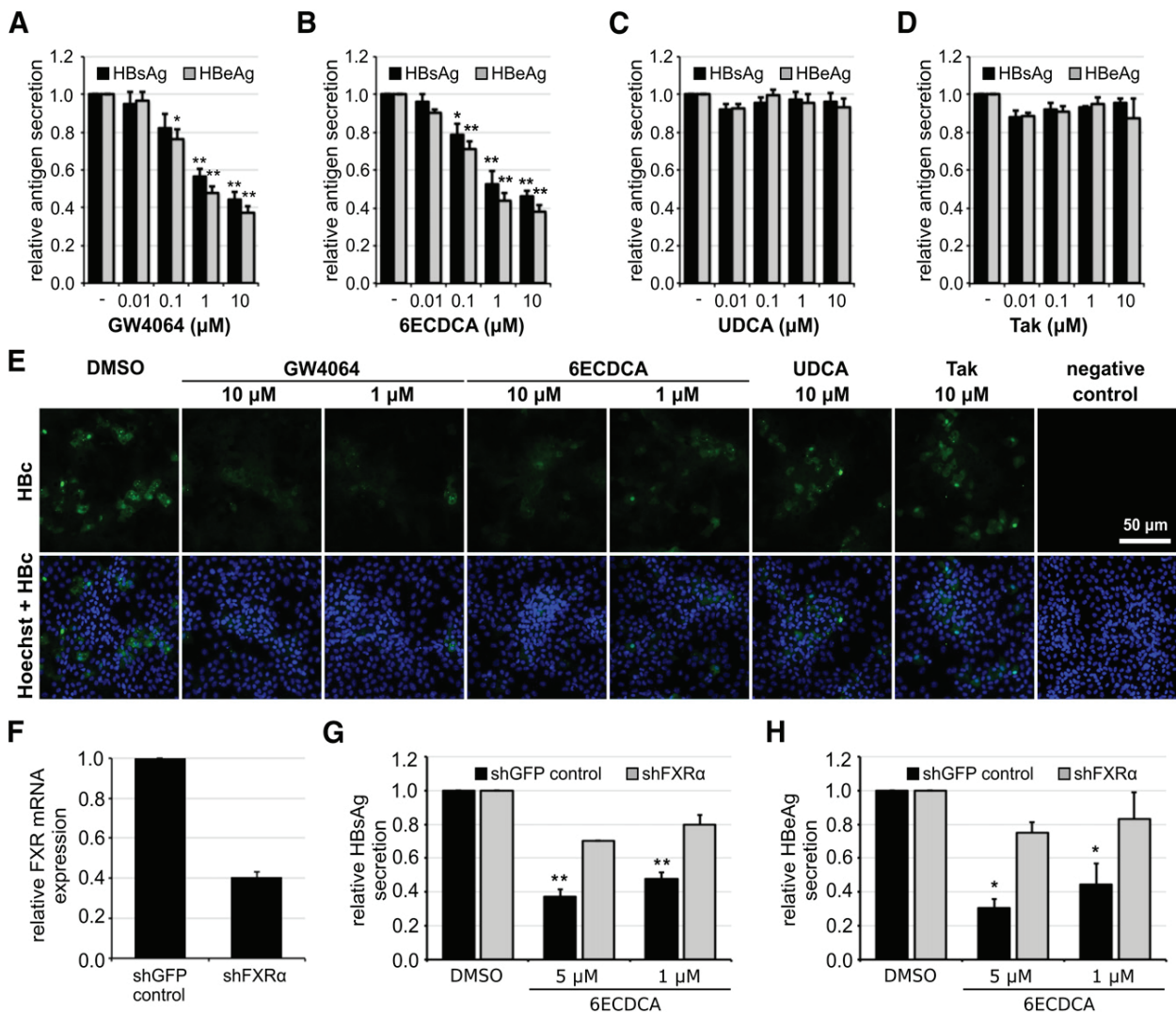
Confluent (80%) undifferentiated HepaRG cells were transduced by using HEK 293T-transfected supernatant that contained lentiviral particles for 24 h post-transduction. Medium was then replaced with complete William's E medium for another 24 h. Cells were then selected and maintained with 3  $\mu$ g/ml puromycin until end of the experiment.

## RESULTS

### FXR agonists inhibit production of HBV proteins in an FXR-dependent manner

Induction of differentiation of HepaRG cells increased FXR expression at RNA and protein levels, as shown in Supplemental Fig. S1. FXR was detected only in cells with hepatocyte-like morphology (18) and in both nuclei and cytoplasm with some heterogeneity; some cells expressed FXR more in the cytoplasm than in the nucleus and *vice versa*, which probably reflects various degrees of differentiation. dHepaRG cells were infected with HBV produced in HepG2.2.15 cells for 24 h. As expected, significant viral protein production in culture supernatant was observed after 12 d of culture (Fig. 1). At d 2 postinfection, cultures were treated or not for 10 d with 2 FXR agonists (GW4064 and the bile salt derivative 6ECDCA) with the FXR antagonist Tak or with UDCA, a bile salt that does not activate



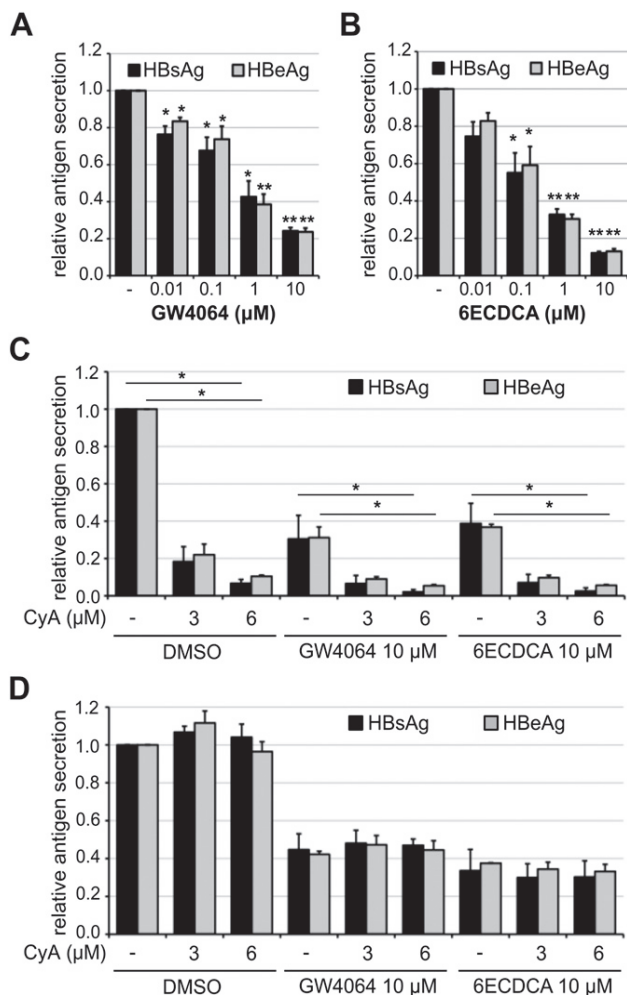


**Figure 1.** FXR agonists inhibit viral proteins production. *A–D*) Relative secretion of HBsAg and HBeAg in dHepaRG cells treated postinfection with a range (10 nM–10 μM) of GW4064 (*A*), 6ECDCA (*B*), UDCA (*C*), and Tak (*D*). Data are means ± SEM of at least 3 independent experiments; Student's *t* test. \**P* < 0.01, \*\**P* < 0.001. *E*) Immunofluorescence showing nuclear (blue) and HbC/HBeAg (green) staining of dHepaRG cells treated or not with FXR modulators. *F*) FXR extinction in dHepaRG cells after shFXR transduction and HBV infection. *G, H*) Relative secretion of HBsAg (*G*) and HBeAg (*H*) in shFXR-transduced dHepaRG cells treated postinfection with 2 doses (1 and 5 μM) of 6ECDCA. Data are means ± SEM of at least 3 independent experiments; Student's *t* test. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, for effect of FXR agonist treatments compared with DMSO, except for FXR mRNA expression in shGFP control vs. shFXR, where *n* = 2 (*F*).

FXR at these concentrations. In this model of HBV infection, the 2 FXR agonists significantly repressed expression of viral proteins HBsAg, HBeAg, and HbC (Fig. 1*A, B, E*), whereas antagonist Tak (Fig. 1*C, E*) as well as UDCA (Fig. 1*D, E*) had no activity. Both FXR agonists repressed HBsAg and HBeAg secretion in a dose-dependent manner with IC<sub>50</sub> values around 1 μM without detectable toxicity (Supplemental Fig. S2). To confirm that effects of the 2 FXR agonists were indeed FXR dependent, we silenced its expression in HepaRG cells with a shFXR lentiviral vector. Partial knockdown of FXR expression in differentiated cells significantly decreased the repression of viral protein secretion by FXR agonist 6-ECDCA (Fig. 1*F, G, H*). When treatment was introduced during the infection period and continued thereafter (Fig. 2*A, B*), IC<sub>50</sub> values were close to 0.1 μM for 6ECDCA and 0.3 μM for GW4064.

### FXR agonists repress HBV replication at a postentry step

Inhibition of HBV protein expression was thus more potent when agonists were present during the infection period, which suggests that the effect could also occur during the virus entry process. Indeed, bile salt derivative 6ECDCA, for instance, could compete with the virus for binding to the NTCP receptor and act as an entry inhibitor. CyA binds to NTCP at a site that overlaps that of bile salts and HBV and is a potent inhibitor of viral entry. As expected, addition of increasing concentrations of CyA during the 24 h of infection reduced, in a dose-dependent manner, HBV protein secretion in supernatant measured after 10 d of culture (Fig. 2*C*). Addition of FXR agonist for 10 d further reduced HBsAg and HBeAg secretion. Conversely, CyA did not affect inhibition of



**Figure 2.** FXR agonists repress HBV replication at a postentry step. *A, B*) Relative secretion of HBsAg and HBeAg by dHepaRG cells treated with a range (10 nM–10  $\mu$ M) of GW4064 (*A*) and 6ECDCA (*B*). Treatments were applied during infection (24 h) and continued until d 12 postinfection. *C, D*) Relative antigen secretion by dHepaRG cells treated with CyA (3 and 6  $\mu$ M) during 24 h of viral infection (*C*) or during the first 3 d of culture with FXR agonists (*D*). Data are means  $\pm$  SEM of at least 3 independent experiments; Student's *t* test. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001.

HBsAg and HBeAg secretion by the 2 agonists when added after inoculation medium change during the first 3 d of culture with FXR agonists (Fig. 2*D*). These data confirm that there is little or no propagation of the virus after initial infection in the dHepaRG model of infection (22), and indicates that effects of the modulation of FXR on HBV expression do not result from competition for the entry receptor but, more likely, proceed at postentry steps.

### FXR agonists repress expression of viral RNA as well as synthesis and secretion of HBV DNA

We next tested the effect of FXR agonists on expression and replication of the HBV genome. The 2 FXR agonists similarly repressed secretion of HBV DNA in supernatant

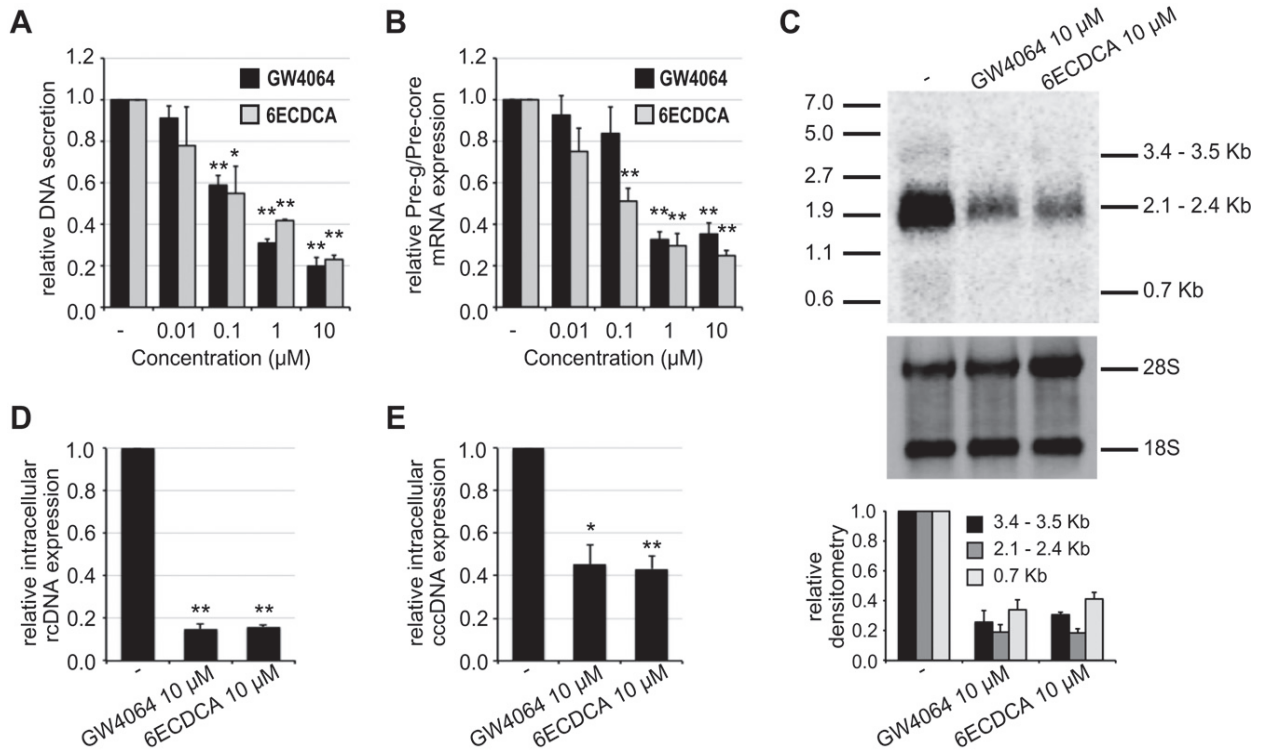
during the last 3 d of the 10-d treatment in a dose-dependent manner (Fig. 3*A*). The 2 agonists were similarly active, with  $IC_{50}$  values around 0.2  $\mu$ M. This finding was corroborated by concomitant inhibition of the expression of pregenomic mRNA and precoreRNA (Fig. 3*B*) and of the intracellular relaxed circular DNA level (Fig. 3*D*). All HBV mRNAs were similarly affected by agonists (Fig. 3*C*). We then investigated whether FXR agonists had an effect on the HBV minichromosome and found a reduction of 50–60% of the quantitative signal measuring the cccDNA pool at d 12 postinfection (Fig. 3*E*). Again, as for HBs and HBe secretion, FXR silencing significantly suppressed the effect of FXR agonists on viral RNA expression (data not shown).

### FXR activation reduces HBV replication in PHHs

Effects of FXR agonists on HBV replication were also investigated in PHHs. All PHHs expressed FXR in both cytosol and nuclei, with the highest level of expression always in nuclei (Supplemental Fig. S1). Cells were infected at d 2 postseeding and treated or not for the next 2 wk. Treatment of noninfected cells with GW4064 had no effect on cell morphology as judged by phase contrast examination (Fig. 4*A*). HBV infection was associated with mild cytopathic effect characterized by some detaching and rounded cells compared with noninfected culture. Of interest, this was not observed when infected cells were treated with FXR agonists (Fig. 4*A*), and no toxicity was noted by protein/total RNA quantification or lactate dehydrogenase release (Supplemental Fig. S2). Moreover, as observed in the dHepaRG cell culture system, FXR agonist GW4064 had a strong inhibitory effect on HBsAg and HBeAg secretion (Fig. 4*B*). Similarly, expression of viral pg/precore RNAs and viral intracellular and secreted DNA was significantly reduced (Fig. 4*C, D*). Finally, the cccDNA pool also seemed to be reduced by treatment (Fig. 4*E*). Similar effects of FXR agonists were observed with PHHs from another donor (Supplemental Fig. S1).

### Effects of HBV infection and FXR agonists on FXR-regulated genes

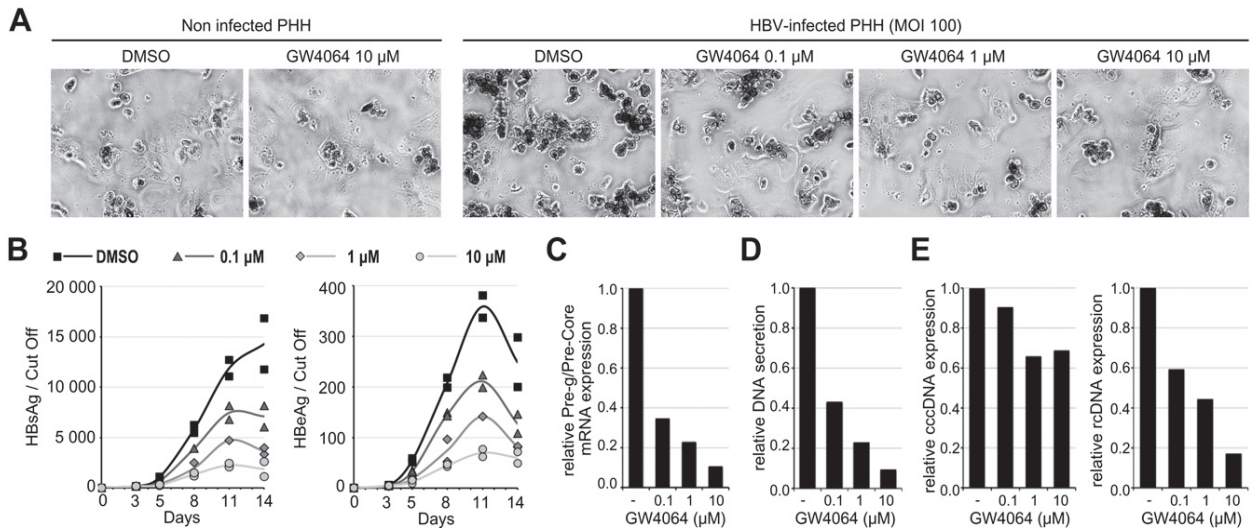
Consequences of HBV infection and of FXR agonists on expression of genes regulated by FXR were investigated in dHepaRG cells and PHHs by monitoring mRNA expression levels of FXR, SHP, APOA1, NTCP, CYP7A1, and CYP8B1, with normalization against 3 housekeeping genes (Fig. 5) (21). In dHepaRG cells (Fig. 5*A*), despite the low proportion of infected cells (<20%), HBV infection induced a small but significant detectable increase of FXR and APOA1 mRNA expression compared with noninfected dHepaRG cells (*P* = 0.05 and *P* = 0.03, respectively). HBV infection did not significantly modify expression of other mRNA in these conditions. Conversely, in PHHs for which the proportions of infected cells were high (Fig. 5*B* and Supplemental Fig. S3), expression of all genes was increased by HBV infection by a factor of 1.5–4. Changes were similar for the 2 PHH



**Figure 3.** Treatment with FXR agonists represses expression of viral RNA and expression and secretion of HBV DNA. *A)* Secretion of viral DNA in cell supernatant during the last 3 d of treatment, quantified by quantitative PCR. *B)* Preg/precure mRNA expression at d 12 postinfection by quantitative RT-PCR. *C)* Northern blot showing all HBV transcripts at d 12 postinfection; quantification of the densitometry of 3 independent experiments was carried out by using ImageJ software. *D, E)* Relative quantification of intracellular relaxed circular DNA (*D*) and cccDNA (*E*) by quantitative PCR. Data are means  $\pm$  SEM of at least 3 independent experiments; Student's *t* test. \**P* < 0.01, \*\**P* < 0.001.

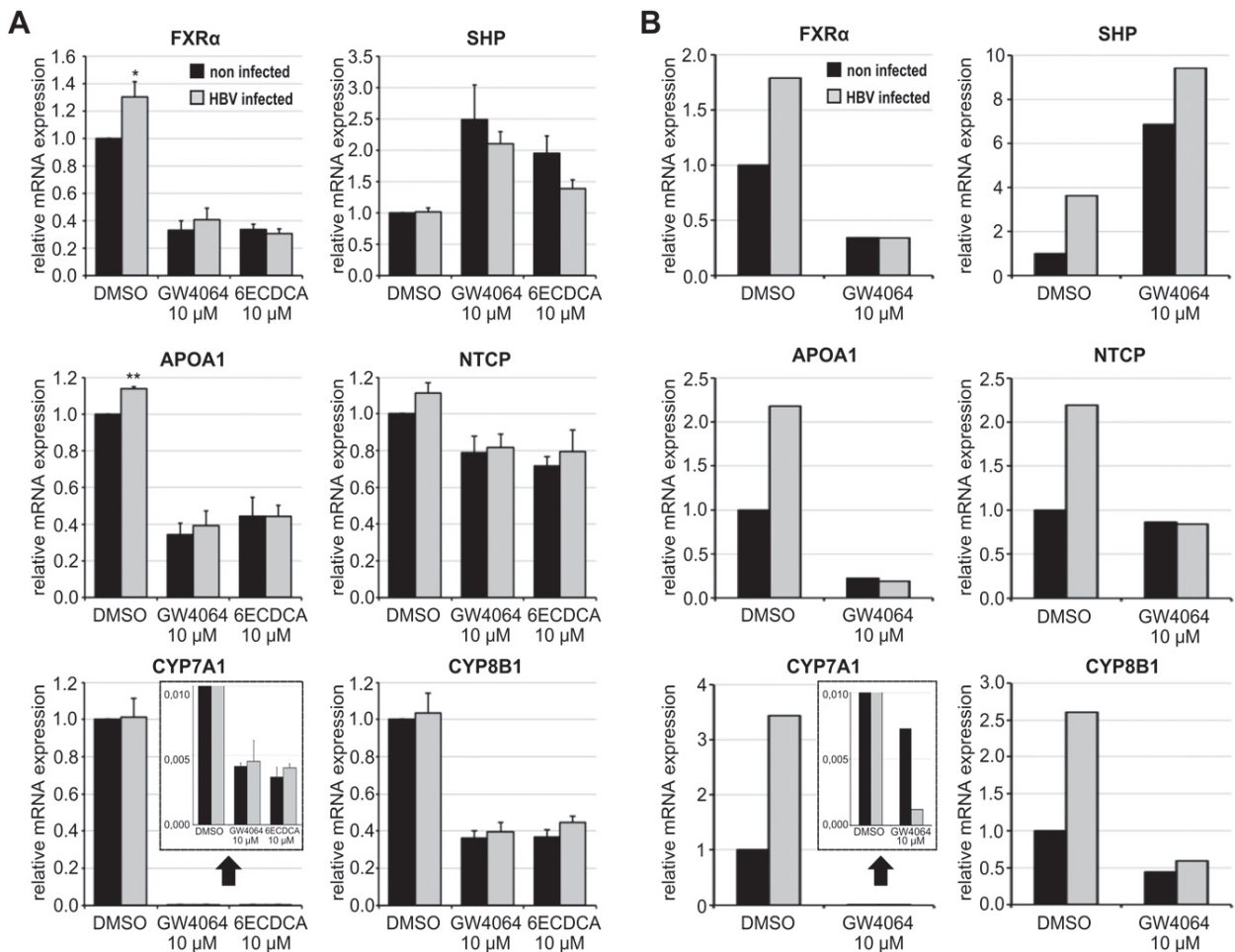
donors. As expected, treatment with FXR agonists repressed mRNA expression of genes under the negative control of FXR, that is, expression of FXR itself as well as that of APOA1, NTCP, CYP7A1, and CYP8B1, and

increased the expression of SHP mRNA, a gene positively regulated by FXR. FXR agonists and HBV infection, thus, had opposite effects on the profile of genes under the negative control of FXR.



**Figure 4.** FXR activation by GW4064 down-regulates HBV replication in PHHs. The following data were obtained in PHHs from a 57-yr-old male donor. *A)* Phase-contrast micrographs of PHHs at d 14 postinfection. *B)* Kinetics of HBsAg and HBeAg secretion after GW4064 treatments, from infection to d 14. Each symbol represents secretion from a single well, and each curve represents the mean of 2 wells from the same condition. *C)* Preg/precure mRNA expression at d 14 postinfection by quantitative RT-PCR. *D)* Secretion of viral DNA in cell supernatant during the last 3 d of treatment, quantified by quantitative PCR. *E)* Relative quantification of intracellular relaxed circular DNA and cccDNA at d 14 postinfection by quantitative PCR. Original magnification,  $\times 20$ .





**Figure 5.** Effects of HBV infection and FXR agonists on bile acids that regulate genes. FXR, SHP, APOA1, NTCP, CYP7A1, and CYP8B1 mRNA expression at d 12 and 14 postinfection by quantitative RT-PCR in dHepaRG cells (A) and PHHs (B), respectively. Data from dHepaRG cells are means  $\pm$  SEM of at least 3 independent experiments; Student's *t* test. All FXR agonist treatments were  $P < 0.05$  (not shown on graphs). Data from PHHs are means of 2 independent culture wells with cells from the same donor as in Fig. 4. Data were normalized against 3 housekeeping genes by mRNA quantification. Inserts show enlargement of the indicated graph areas. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  for effect of HBV infection.

### FXR agonist treatment rescued partial inhibition of HBV DNA synthesis by a polymerase inhibitor at suboptimal concentration

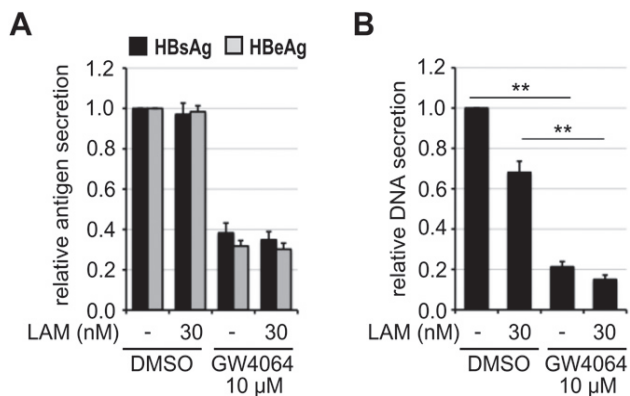
Because we observed that FXR agonists decreased expression of pg/precore RNAs, we investigated whether partial repression of viral DNA replication by suboptimal concentrations of the reverse transcriptase inhibitor, lamivudine (LAM), could be enhanced by treatment with FXR agonists. In this system, and as expected, LAM treatment had no effect on HBsAg and HBeAg secretion regardless of whether cells were treated with FXR agonists (Fig. 6A). Low LAM concentrations already reduced viral DNA synthesis and release at 70% of control, and addition of GW4064 further and significantly limited viral DNA secretion, reducing it 15% (Fig. 6B).

### DISCUSSION

This study further reveals the complex interdependency of HBV infection and the FXR pathway in 2 cell culture

systems permissive to HBV infection. HBV infection modifies expression of FXR and its regulated genes in both cell culture systems, even if effects were more impressive in PHHs than in dHepaRG cells. This likely reflects the lower proportion of infected cells in dHepaRG cultures than in PHHs, which results in signal dilution. This also further strengthens the significance of variations of FXR and APOA1 mRNA expression induced by HBV infection that are observed in both systems. Overall, increases of FXR, CYP7A1, and APOA1 mRNA expression are consistent with those observed *ex vivo* in liver biopsies of infected patients and/or in liver of humanized mouse model of HBV infection (17). In addition, we found that expression of NTCP and CYP8B1 was also increased by HBV infection in PHHs. Altogether, data suggest that HBV infection maintains FXR at a low activity level, which allows the transcription of genes that, directly or indirectly, are negatively controlled by FXR—CYP7A1, CYP8B1, NTCP, APOA1, and FXR itself—which thus appeared significantly overexpressed in both cell models (23–25). Repression of FXR activity by HBV infection, as previously proposed (17), is likely a result of the decrease of intracellular concentrations of





**Figure 6.** FXR agonist treatment rescued partial inhibition of HBV DNA synthesis by polymerase inhibitor at suboptimal concentrations. Relative secretion of antigens (A) and viral DNA (B) in dHepaRG cell supernatant during the last 3 d of treatment with GW4064 and/or LAM. Data are means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments; Student's *t* test. \*\**P* < 0.001.

natural FXR ligands that results from competition between circulating virions or secreted HBs and bile salts for NTCP. One intriguing observation is that HBV increases SHP expression in PHHs, whereas its expression is not modified in dHepaRG cells or is even decreased in liver of infected patients (17). These differences might be explained by variations in cellular models and experimental conditions that do not totally mimic the liver environment; however, as SHP expression is positively controlled by FXR, this suggests that other mechanisms might be involved. Additional studies are clearly warranted to fully understand how HBV changes FXR expression and activity.

As many other cellular functions—beyond bile acid metabolism—are modulated by FXR (24), the HBV-induced change of its activity may likely contribute to creation of a specific cellular metabolic environment favorable to HBV replication. For example, it was recently reported that FXR activation represses transcriptional regulation of autophagy by cAMP response element binding protein and peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  (26, 27). Because the autophagic pathway is required for HBV replication and envelopment, and HBV modulates several components of this pathway (28–31), modulation of FXR activity by HBV may contribute to maintenance of sustained autophagic flux. Of interest, FXR agonists reverse all observed modifications of gene expression but that of SHP. Indeed, the most striking consequence of the 10- to 12-d-long treatment with FXR agonists was repression of FXR expression, which was likely a result of the retro-control of FXR on its own expression mediated by SHP (23). FXR expression repression was noticed at both mRNA and protein levels. FXR became barely detectable by immunofluorescence, thus dramatically contrasting and counterbalancing overexpression induced by HBV.

We show here that 2 well-characterized FXR agonists, 6-ECDCA and GW4064, with 2 different structures have strong inhibitory effects on HBV replication in dHepaRG cells and in PHHs. In contrast, the FXR-independent bile acid, UDCA, or FXR antagonist had no effect. In principle, FXR ligands could compete with HBV virions for binding to NTCP; however, this possibility was ruled out as the

HBV entry inhibitor, CyA, did not modify the course of infection when added after the infection step, whereas agonists inhibited production of all viral elements in the same conditions (22). In addition, knockdown of FXR in dHepaRG cells almost completely suppressed the effects of FXR agonists. Altogether, these data suggest that FXR agonists interfere in viral replication at later steps of the viral cycle by directly acting on FXR and controlling the transcriptional activity of cccDNA. Inhibition of viral DNA and protein synthesis could mainly be the consequences of reduced viral mRNA expression.

These findings may seem surprising, as previous reports have shown that the effects of FXR expression and activation favor expression of the viral genome (12, 13); however, in previous studies, effects of FXR agonists on EnII/Cp were exemplified with luciferase gene reporter constructs under control of the EnII/Cp region and with overexpression of FXR and RXR. Without concomitant overexpression of these factors, effects of FXR agonists on transcriptional activity varied with the basal expression of FXR and other cofactors (PGC-1 $\alpha$  and SIRT1) in the cell lines tested—Huh-7 *vs.* HepG2 or HEK293T, a cell line of nonhepatic origin. When full-length or 1.3 full-length HBV genomes were transfected in the same test cell lines, effects of FXR agonists were again more pronounced when FXR and RXR were also overexpressed. These studies clearly demonstrate that FXR binds to the 2 putative FXR response elements we identified in the EnhII/Cp region, somehow in a dose-dependent manner, and that it is functional, regulating transcriptional activity of the promoter. It is worthwhile to mention that, in these experiments, effects of FXR agonists on reporter or viral genes were only monitored during the first 24 or 48 h after transfection and treatment with FXR ligands. Under these conditions, any regulatory feedback loops that could possibly interfere in the transcriptional activity of the EnhII/Cp region could not be detected.

Conversely, effects of FXR ligands were tested over a 10-d, complete HBV replication cycle in the present study, which allowed deployment of long-term effects of FXR stimulation, such as sustained FXR expression down-regulation. FXR agonist-induced repression of HBV replication might thus result from shutdown of the FXR-dependent activation of the transcriptional activity of EnhII/Cp, which has proved sufficient to induce HBV expression in cells of nonhepatic origin (12, 13). Differential binding affinity of FXR to viral and cellular promoters as a result of FXRE sequence differences, or to FXR post-translational modifications, depending on recruitment of cofactors on these DNA regions, could explain why low FXR expression levels might not be sufficient to activate the viral promoter while remaining high enough for cellular gene regulatory regions. Of note, treatment with FXR antagonist, Tak, did not further increase expression of FXR in these experimental conditions (Supplemental Fig. S1), and no modification of HBV replication was noticed.

It is therefore tempting to envision FXR activation as a new therapeutic option to control HBV replication. FXR activation could directly repress HBV transcription and correct virus-induced metabolic modifications, indirectly rendering the cellular environment less favorable to viral

replication. Of interest, FXR agonists have already been tested, with interesting results in long-term clinical trials for primary biliary cirrhosis or nonalcoholic steatohepatitis, with few adverse effects (32, 33). Of note, suboptimal concentrations of the reverse transcriptase inhibitor LAM only partially inhibit viral DNA synthesis, and we found that FXR agonist add-on further restrains viral DNA synthesis, which somehow rescues incomplete reverse transcriptase inhibition. Altogether, these findings suggest that FXR agonists could be used in combination with nucleotide analogues to repress the replication of HBV by additional mechanisms that act upstream of reverse transcription. **[F]**

The authors thank Stéphane Joly (EnyoPharma, Lyon, France) for technical assistance and expertise. This work was funded, in part, by grants from the Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les Hépatites (2AO 2013 and IAO 2015), Finovi, FP7 EC Network SCR&Tox (Grant Agreement 266753), and EnyoPharma. V.L. and P.A. are cofounders of EnyoPharma, Lyon. Author contributions: V. Lotteau and P. André designed research, analyzed data and wrote the manuscript; P. Radreau and M. Porcherot performed the experiments, analyzed data and contributed to the manuscript writing; and C. Ramière and K. Mouzannar contributed reagents and experiments.

## REFERENCES

- Ganem, D., and Prince, A. M. (2004) Hepatitis B virus infection—natural history and clinical consequences. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1118–1129
- European Association For The Study Of The Liver. (2012) EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* **57**, 167–185
- Urban, S., Schulze, A., Dandri, M., and Petersen, J. (2010) The replication cycle of hepatitis B virus. *J. Hepatol.* **52**, 282–284
- Yan, H., Zhong, G., Xu, G., He, W., Jing, Z., Gao, Z., Huang, Y., Qi, Y., Peng, B., Wang, H., Fu, L., Song, M., Chen, P., Gao, W., Ren, B., Sun, Y., Cai, T., Feng, X., Sui, J., and Li, W. (2012) Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife* **1**, e00049
- Rabe, B., Delaleau, M., Bischof, A., Foss, M., Sominskaya, I., Pumpens, P., Cazenave, C., Castroviejo, M., and Kann, M. (2009) Nuclear entry of hepatitis B virus capsids involves disintegration to protein dimers followed by nuclear reassociation to capsids. *PLoS Pathog.* **5**, e1000563
- Nassal, M. (2008) Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. *Virus Res.* **134**, 235–249
- Belloni, L., Pollicino, T., De Nicola, F., Guerrieri, F., Raffa, G., Fanciulli, M., Raimondo, G., and Levvero, M. (2009) Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 19975–19979
- Bock, C. T., Schwinn, S., Locarnini, S., Fyfe, J., Manns, M. P., Trautwein, C., and Zentgraf, H. (2001) Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome. *J. Mol. Biol.* **307**, 183–196
- Levrero, M., Pollicino, T., Petersen, J., Belloni, L., Raimondo, G., and Dandri, M. (2009) Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* **51**, 581–592
- Seeger, C., and Mason, W. S. (2000) Hepatitis B virus biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 51–68
- Quasdorff, M., and Protzer, U. (2010) Control of hepatitis B virus at the level of transcription. *J. Viral Hepat.* **17**, 527–536
- Ramière, C., Scholtès, C., Diaz, O., Icard, V., Perrin-Cocon, L., Traubaud, M.-A., Lotteau, V., and André, P. (2008) Transactivation of the hepatitis B virus core promoter by the nuclear receptor FXRalpha. *J. Virol.* **82**, 10832–10840
- Curtill, C., Enache, L. S., Radreau, P., Dron, A.-G., Scholtès, C., Deloire, A., Roche, D., Lotteau, V., André, P., and Ramière, C. (2014) The metabolic sensors FXR $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ , and SIRT1 cooperatively regulate hepatitis B virus transcription. *FASEB J.* **28**, 1454–1463
- Shlomai, A., Paran, N., and Shaul, Y. (2006) PGC-1 $\alpha$  controls hepatitis B virus through nutritional signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 16003–16008
- Bar-Yishay, I., Shaul, Y., and Shlomai, A. (2011) Hepatocyte metabolic signalling pathways and regulation of hepatitis B virus expression. *Liver Int.* **31**, 282–290
- Yan, H., Peng, B., Liu, Y., Xu, G., He, W., Ren, B., Jing, Z., Sui, J., and Li, W. (2014) Viral entry of hepatitis B and D viruses and bile salts transportation share common molecular determinants on sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *J. Virol.* **88**, 3273–3284
- Oehler, N., Volz, T., Bhadra, O. D., Kah, J., Allweiss, L., Giersch, K., Bierwolf, J., Riecken, K., Pollok, J. M., Lohse, A. W., Fehse, B., Petersen, J., Urban, S., Lütgehetmann, M., Heeren, J., and Dandri, M. (2014) Binding of hepatitis B virus to its cellular receptor alters the expression profile of genes of bile acid metabolism. *Hepatology* **60**, 1483–1493
- Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaise, D., Cannie, I., Guyomard, C., Lucas, J., Trepo, C., and Guguen-Guillouzo, C. (2002) Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 15655–15660
- Parent, R., Marion, M.-J., Furio, L., Trépo, C., and Petit, M.-A. (2004) Origin and characterization of a human bipotent liver progenitor cell line. *Gastroenterology* **126**, 1147–1156
- Sells, M. A., Chen, M. L., and Acs, G. (1987) Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 1005–1009
- Werle-Lapostolle, B., Bowden, S., Locarnini, S., Wursthorn, K., Petersen, J., Lau, G., Trepo, C., Marcellin, P., Goodman, Z., Delaney IV, W. E., Xiong, S., Brosgart, C. L., Chen, S.-S., Gibbs, C. S., and Zoulim, F. (2004) Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology* **126**, 1750–1758
- Nkongolo, S., Ni, Y., Lempp, F. A., Kaufman, C., Lindner, T., Esser-Nobis, K., Lohmann, V., Mier, W., Mehrle, S., and Urban, S. (2014) Cyclosporin A inhibits hepatitis B and hepatitis D virus entry by cyclophilin-independent interference with the NTCIP receptor. *J. Hepatol.* **60**, 723–731
- Boulias, K., Katrakili, N., Bamberg, K., Underhill, P., Greenfield, A., and Talianidis, I. (2005) Regulation of hepatic metabolic pathways by the orphan nuclear receptor SHP. *EMBO J.* **24**, 2624–2633
- Lefebvre, P., Cariou, B., Lien, F., Kuipers, F., and Staels, B. (2009) Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol. Rev.* **89**, 147–191
- Lu, T. T., Makishima, M., Repa, J. J., Schoonjans, K., Kerr, T. A., Auwerx, J., and Mangelsdorf, D. J. (2000) Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol. Cell* **6**, 507–515
- Lee, J. M., Wagner, M., Xiao, R., Kim, K. H., Feng, D., Lazar, M. A., and Moore, D. D. (2014) Nutrient-sensing nuclear receptors coordinate autophagy. *Nature* **516**, 112–115
- Seok, S., Fu, T., Choi, S.-E., Li, Y., Zhu, R., Kumar, S., Sun, X., Yoon, G., Kang, Y., Zhong, W., Ma, J., Kemper, B., and Kemper, J. K. (2014) Transcriptional regulation of autophagy by an FXR-CREB axis. *Nature* **516**, 108–111
- Kim, S.-J., Khan, M., Quan, J., Till, A., Subramani, S., and Siddiqui, A. (2013) Hepatitis B virus disrupts mitochondrial dynamics: induces fission and mitophagy to attenuate apoptosis. *PLoS Pathog.* **9**, e1003722
- Li, J., Liu, Y., Wang, Z., Liu, K., Wang, Y., Liu, J., Ding, H., and Yuan, Z. (2011) Subversion of cellular autophagy machinery by hepatitis B virus for viral envelopment. *J. Virol.* **85**, 6319–6333
- Mao, Y., Da, L., Tang, H., Yang, J., Lei, Y., Tiollais, P., Li, T., and Zhao, M. (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**, 68–74
- Sir, D., Tian, Y., Chen, W. L., Ann, D. K., Yen, T.-S. B., and Ou, J. H. (2010) The early autophagic pathway is activated by hepatitis B virus and required for viral DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 4383–4388
- Hirschfeld, G. M., Mason, A., Luketic, V., Lindor, K., Gordon, S. C., Mayo, M., Kowdley, K. V., Vincent, C., Bodhenheimer, H. C., Jr., Parés, A., Trauner, M., Marschall, H.-U., Adorini, L., Sciacca, C., Beecher-Jones, T., Castellor, E., Böhm, O., and Shapiro, D. (2015) Efficacy of obeticholic acid in patients with primary biliary cirrhosis and inadequate response to ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology* **148**, 751–761.e8
- Mudaliar, S., Henry, R. R., Sanyal, A. J., Morrow, L., Marschall, H. U., Kipnes, M., Adorini, L., Sciacca, C. I., Clopton, P., Castellor, E., Dillon, P., Pruzanski, M., and Shapiro, D. (2013) Efficacy and safety of the farnesoid X receptor agonist obeticholic acid in patients with type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* **145**, 574–582.e1

Received for publication April 19, 2016.  
Accepted for publication May 23, 2016.

## Reciprocal regulation of farnesoid X receptor $\alpha$ activity and hepatitis B virus replication in differentiated HepaRG cells and primary human hepatocytes

Pauline Radreau, Marine Porcherot, Christophe Ramière, et al.

*FASEB J* 2016 30: 3146-3154 originally published online June 1, 2016

Access the most recent version at doi:[10.1096/fj.201500134](https://doi.org/10.1096/fj.201500134)

- 
- Supplemental Material** <http://www.fasebj.org/content/suppl/2016/06/01/fj.201500134.DC1>
- References** This article cites 33 articles, 13 of which can be accessed free at:  
<http://www.fasebj.org/content/30/9/3146.full.html#ref-list-1>
- Subscriptions** Information about subscribing to *The FASEB Journal* is online at  
<http://www.faseb.org/The-FASEB-Journal/Librarian-s-Resources.aspx>
- Permissions** Submit copyright permission requests at:  
<http://www.fasebj.org/site/misc/copyright.xhtml>
- Email Alerts** Receive free email alerts when new an article cites this article - sign up at  
<http://www.fasebj.org/cgi/alerts>
- 



**More than Lipids**  
Solutions for the entire product cycle:  
Research to Commercialization





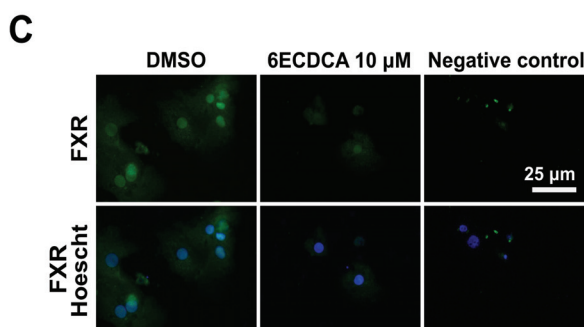
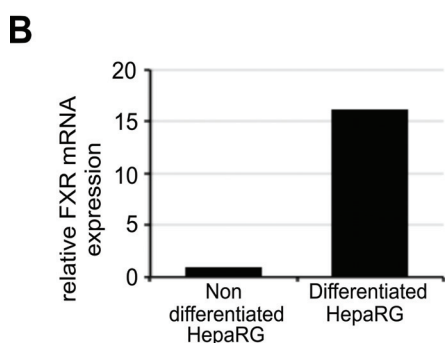
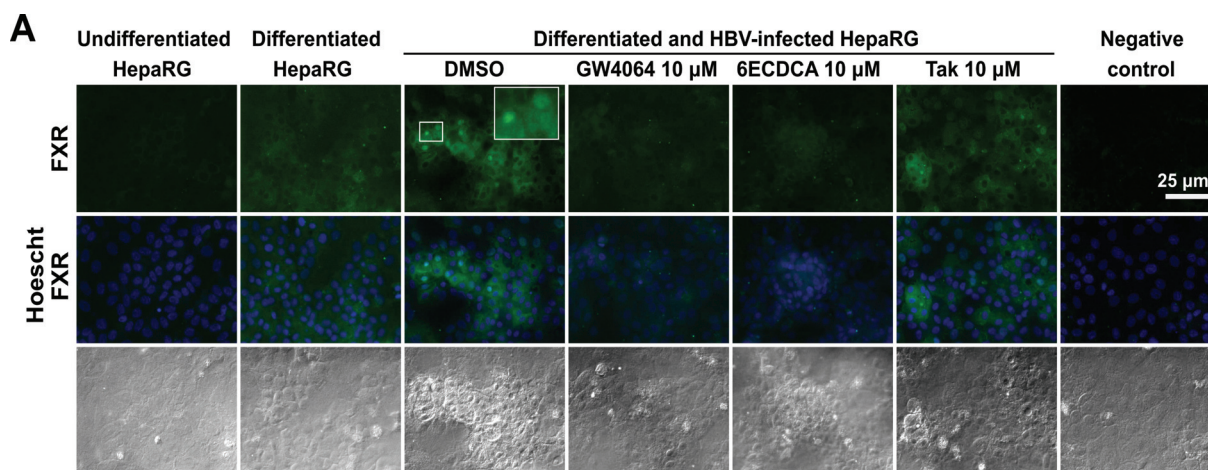
## Supplementary figure S1. Expression of FXR in HepaRG and primary human hepatocytes (PHH)

(A) Immunofluorescence showing FXR (green) and nuclear (blue) staining of HepaRG cells in the two stages of differentiation and following HBV infection and FXR agonist treatments. Insert shows 3x magnification of the indicated area. (B) *FXR* mRNA expression in differentiated and undifferentiated HepaRG cells (one representative experiment). (C) Immunofluorescence showing FXR (green) and nuclear (blue) staining of PHH following HBV infection and 6ECDCA treatments at day 4 (or 7) post infection. These micrographs were obtained using cryopreserved PHH from a 59-year-old male donor.

Methods: In this figure, HepaRG cells and PHH were stained with the rabbit polyclonal anti-FXR antibody (#sc-13063 from Santa Cruz, Dallas, Texas, USA) and visualized with Alexa 488-conjugated anti-rabbit secondary antibody (#A-11070, Life Technologies).

*FXR* mRNA expression was obtained following the protocol described in Materials and Methods, Analysis of RNA.

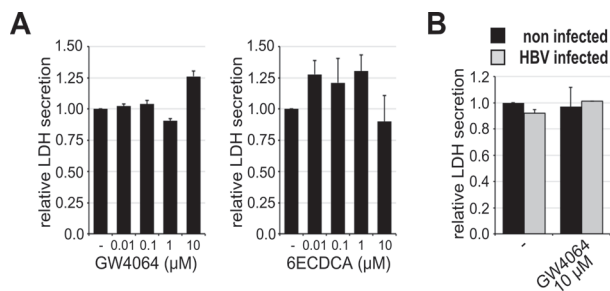
Differentiation of HepaRG cells increased *FXR* mRNA expression by 16 fold (panel B) and allowed the detection of FXR by immunofluorescence in cell with hepatocyte-like morphology (panel A). FXR was detected both in the cytoplasm and the nuclei of these cells with some heterogeneity, likely indicating that all cells did not reach the same degree of differentiation. HBV infection seemed to increase the expression of FXR and treatment with GW4064 or 6ECDCA rendered the detection of FXR difficult, at the limit of detection level, while Tak, the FXR antagonist, did not appear to further enhance the nuclear factor expression. All PHH expressed high level of FXR with a predominant staining in the nuclei (panel C). Treatment with the FXR agonist 6ECDCA similarly repressed the expression of FXR.



## Supplementary figure S2. Absence of toxicity of FXR agonists, GW4064 and 6-ECDC, for HepaRG and PHH

Lactate dehydrogenase (LDH) secretion in cell supernatant following FXR agonist treatments. (A) Secretion of LDH in the dHepaRG cell supernatant during the last 3 days of treatment with GW4064 and 6ECDC (B) (with a range of doses :10 nM to 10  $\mu$ M). Secretion of LDH in the PHH supernatant during the last 3 days of treatment with 10  $\mu$ M GW4064.

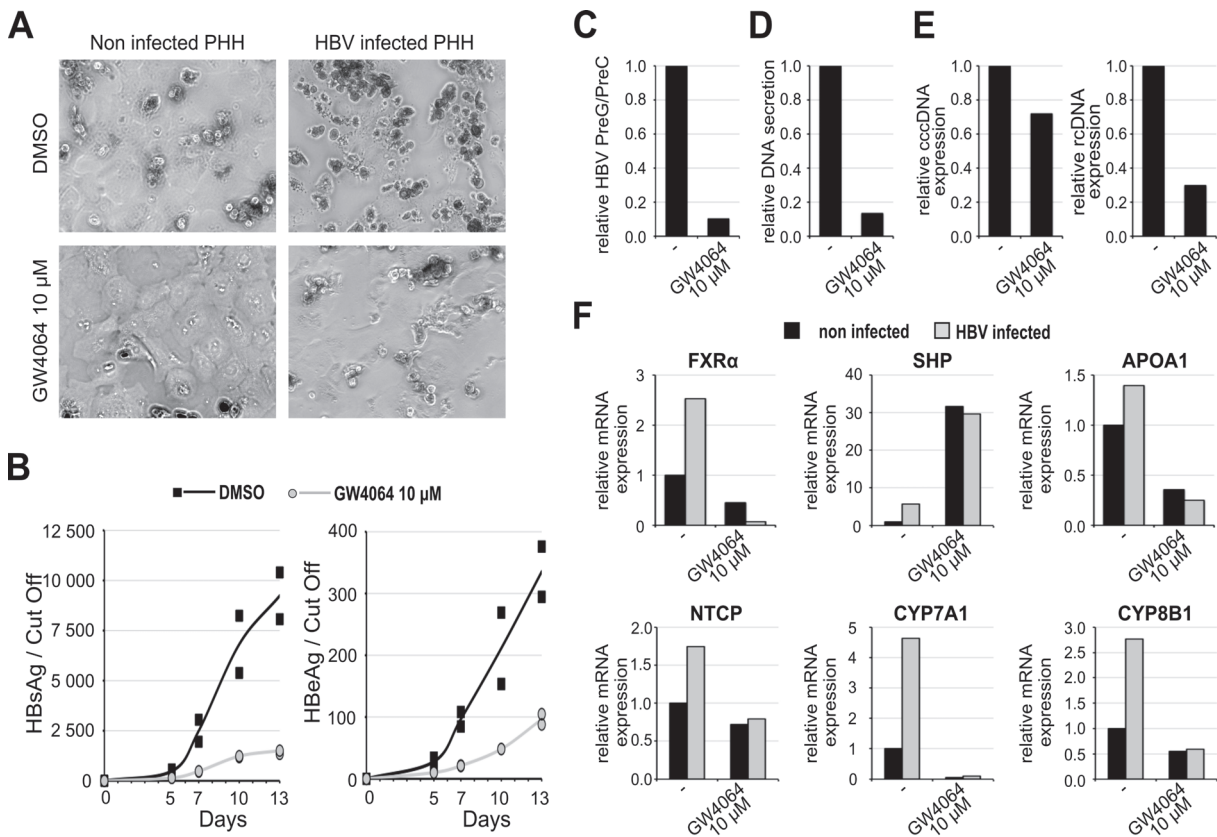
Methods: LDH secretion was measured in dHepaRG supernatant from the last 3 days of treatment using the cytotoxicity detection kit (Roche) according to the manufacturer's instructions.



**Supplementary figure S3. FXR activation by GW4064 down-regulates HBV replication in PHH and reverses the HBV-induced cellular gene modifications.**

FXR activation by GW4064 down-regulates HBV replication in PHH. All the following data were obtained in PHH from a 72-year-old female donor. **(A)** Phase-contrast micrographs of PHH (Magnification 20x) at day 13 post infection. **(B)** Kinetics of HBsAg and HBeAg secretion following GW4064 treatments from infection to day 13. Each symbol represents the secretion from a single well and each curve represents the mean of 2 wells from the same condition. **(C)** pre-g/pre-core mRNA expression at day 13 post infection by quantitative RT-PCR. **(D)** Secretion of viral DNA in the cell supernatant during the last 3 days of treatment quantified by quantitative PCR. **(E)** Relative expression of intracellular rcDNA and cccDNA at day 13 post infection by quantitative PCR. **(F)** *FXR*, *Shp*, *ApoA1*, *NTCP*, *Cyp7a1* and *Cyp8b1* mRNA expression at day 13 post infection by quantitative RT-PCR.

Methods: All the experiments shown in his figure were carried out following the protocols described in Materials and Methods.



## II. Deuxième étude

**L'activation du farnesoid X receptor alpha réprime son activité proviral de contrôle de la taille du pool de cccDNA du virus de l'hépatite B et de sa transcription**

Karim Mouzannar, Floriane Fusil, Benoît Lacombe, Anaïs Ollivier, Camille Ménard, Vincent Lotteau, François-Loïc Cosset, Christophe Ramière, Patrice André.

Article soumis à *Hepatology*, mai 2018.



## Activation of Farnesoid X Receptor alpha represses its proviral activity in controlling hepatitis B virus cccDNA pool size and transcription

Karim Mouzannar<sup>1</sup>, Floriane Fusil<sup>1</sup>, Benoît Lacombe<sup>1</sup>, Anaïs Ollivier<sup>1</sup>, Camille Ménard<sup>1</sup>, Vincent Lotteau<sup>1</sup>, François-Loïc Cosset<sup>1</sup>, Christophe Ramière<sup>1,2</sup>, Patrice André<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>CIRI – Centre International de Recherche en Infectiologie, Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Inserm, U1111, CNRS, UMR5308, ENS Lyon, F-69007, Lyon, France.

<sup>2</sup>Laboratoire de Virologie, Hôpital de la Croix-Rousse, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

*Running title:* Role of FXR in HBV replication

*e-mails:*

[karim.mouzannar@inserm.fr](mailto:karim.mouzannar@inserm.fr)

[floriane.fusil@ens-lyon.fr](mailto:floriane.fusil@ens-lyon.fr)

[benoit.lacombe@inserm.fr](mailto:benoit.lacombe@inserm.fr)

[anais.ollivier@ens-lyon.fr](mailto:anais.ollivier@ens-lyon.fr)

[camille.menard@inserm.fr](mailto:camille.menard@inserm.fr)

[vincent.lotteau@inserm.fr](mailto:vincent.lotteau@inserm.fr)

[flcosset@ens-lyon.fr](mailto:flcosset@ens-lyon.fr)

[christophe.ramiere@inserm.fr](mailto:christophe.ramiere@inserm.fr)

[patrice.andre@inserm.fr](mailto:patrice.andre@inserm.fr)

*Keywords:*

HBV; FXR $\alpha$ ; HBx; bile acids; mouse model

*\*Corresponding Author:*

Patrice André

Inserm U1111, 21 avenue Tony Garnier, 69007 Lyon, France

Phone: +33 4 37 28 23 27

Fax: +33 4 37 28 23 41

e-mail: [patrice.andre@inserm.fr](mailto:patrice.andre@inserm.fr)

*Potential conflict of interest:*

PA and VL are co-founders and consultants for EnyoPharma SAS. Other coauthors have nothing to report

*Abbreviations:*

APOA1, apolipoprotein A1; BA, bile acid; BSEP, bile salt export pump; cccDNA, covalently closed circular DNA; CYP7A1, cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1; dHepaRG, differentiated HepaRG; FXR $\alpha$ , farnesoid X receptor alpha; HBV, hepatitis B virus; HBx, hepatitis B viral X protein; NTCP, sodium taurocholate

1  
2  
3 cotransporting polypeptide; NUCs, nucleotide analogues; PHH, primary human  
4 hepatocytes; rcDNA, relaxed circular DNA; SHP, small heterodimer partner.  
5

6 *Financial support:*

7 This work was supported by the French “Agence Nationale de la Recherche sur le  
8 SIDA et les hépatites virales” (ANRS) and the LabEx Ecofect (ANR-11-LABX-0048)  
9 of the “Université de Lyon”, within the program “Investissements d’Avenir” (ANR-11-  
10 IDEX-0007) operated by the French National Research Agency (ANR). BL and CM’s  
11 wages are supported by a collaboration contract between Inserm and EnyoPharma.  
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

For Peer Review

## Abstract

Hepatitis B virus (HBV) infection and bile acid (BA) metabolism are highly interdependent. HBV and BA compete for the sodium taurocholate cotransporter polypeptide for cell entry. This competition impacts BA cellular concentration with consequences on BA nuclear receptor farnesoid X receptor alpha (FXR $\alpha$ ) functions and expression. Notably, it has been shown that FXR $\alpha$  binds two response elements in the enhancer 2 - core promoter region of the HBV genome and that treatment with FXR $\alpha$  agonists repress HBV replication in primary human hepatocytes and differentiated HepaRG cells (dHepaRG), two relevant cell models of HBV infection. To decipher the role of FXR $\alpha$  in HBV infection, FXR $\alpha$  knockdown and treatment with FXR $\alpha$  agonist GW4064 were performed in infected dHepaRG. Wild-type HBV or a virus deficient for the expression of HBV X protein (HBx) were used to determine HBx contribution to FXR $\alpha$ -related modulation of HBV infection. FXR $\alpha$  silencing or treatment with agonist decreased viral covalently closed circular DNA (cccDNA) pool size and transcriptional activity. Treatment with FXR $\alpha$  agonist inhibited FXR $\alpha$  proviral effect on cccDNA in an HBx-independent manner, whereas agonist-induced inhibition of pre-genomic and pre-core RNAs transcription and viral DNA secretion was HBx-dependent. These data indicated that FXR $\alpha$  acted as a proviral factor by two independent mechanisms, which were abolished by FXR $\alpha$  activation. Finally, four-week GW4064 treatment of C3H/HeN mice infected with a recombinant AAV2/8-HBV vector decreased secretion of HBV DNA and HBs antigen in adult but not in young mice. **Conclusion:** Collectively, these results suggest that the physiological balance of FXR $\alpha$  expression and activation by BA is a key host metabolic pathway in regulation of HBV infection and that FXR $\alpha$  could be envisioned as target for HBV treatment.

## Introduction

Hepatitis B virus (HBV) infection remains a major public health problem with an estimate of 250 million people chronically infected who are at risk of developing fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma (1). The current orally available nucleotide analogues (NUCs) that inhibit viral polymerase are widely used to treat active hepatitis B. However, despite their efficacy in controlling the disease, they usually cannot be stopped because of frequent viral reactivations at treatment cessation. Interferon-based therapies are often not well-tolerated and the rate of functional cure, defined as sustained viral suppression, is low (2). The main limit of these treatments relies on their failure to eradicate or to repress HBV episomal covalently closed circular DNA (cccDNA), which represents the persistent form of the viral genome and the template for viral transcription (3). A better understanding of the mechanisms that control viral persistence and reactivation is essential to propose new therapeutic targets to increase the rate of functional cure.

Hepatitis B virion contains a capsid, composed of core proteins, which is embedded into surface antigen (HBsAg) envelope. Within the capsid, the 5' end of the negative strand of the 3.2 kb partially double-stranded relax circular DNA (rcDNA) is covalently linked to the viral polymerase. HBsAg binds to heparan sulfate proteoglycans and sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) at hepatocytes plasma membrane. Then the capsid is released into the cytoplasm and migrates to nuclear pores where the viral genome enters the nucleus. Activation of host DNA repair mechanisms allows completion of viral genome synthesis with viral polymerase excision, gap filling and nicks repair (4). Cellular and viral factors are recruited on newly completed cccDNA, which persists as episomal chromatin in infected hepatocytes (3). HBV replication depends on epigenetic factors that regulate protein expression from viral DNA (5). cccDNA transcription is regulated by two enhancer regions (Enh 1 and 2) and four promoters (basal core, preS1, S2, and X) that control the synthesis of 3.5 kb pregenomic (pg) and precore (preC) RNAs, 2.4 and 2.1 kb preS1 and preS2/S RNAs, and a 0.7 kb X RNA. The pg-RNA encodes core proteins, HBV polymerase, triggers their co-packaging into new nucleocapsids and allows initiation of reverse transcription by the viral polymerase. Mature rcDNA containing nucleocapsids can then acquire HBsAg envelope and be secreted as infectious particles or traffic back to the nucleus to contribute to cccDNA pool. The preC-RNA codes for the secreted HBe antigen (HBeAg), while preS1 and preS2/S RNAs encode long (L), medium (M) and short (S) HBsAg. Finally, the X RNA encodes HBV X protein (HBx). This viral protein plays a crucial role in recruiting epigenetic factors on the cccDNA and favoring its transcriptional activity (6).

The cccDNA regulatory regions contain binding sites for multiple transcription factors (7). Among these transcription factors, several liver-enriched nuclear receptors (HNF4 $\alpha$ , PPAR $\alpha$ /RXR $\alpha$ , FXR $\alpha$ ) seem to play a key role in HBV transcription. The role of nuclear receptors in HBV regulation was generally attested by studies in hepatocarcinoma cell lines following HBV genome transfection or gene complementation in cells of non-hepatic origin. *In vivo* studies are few and mostly rely on HBV transgenic mice in which one copy of 1.3 fold overlength HBV genome (1.3xHBV) has been integrated into host cell genome. These mice express all HBV proteins and produce infectious virions but without detectable cccDNA, implying that the regulation of HBV transcription might significantly differ from *bona fide* episomal cccDNA (8). These models nevertheless helped to establish a physiological role of PPAR $\alpha$ /RXR $\alpha$  heterodimers in HBV transcription. Interestingly, several nuclear

1  
2  
3 factors, PPAR $\alpha$ , HNF4 $\alpha$  and FXR $\alpha$ , can bind to multiple target sequences in  
4 promoter and enhancer regions with sometimes different outcomes (9). For instance,  
5 three target sequences have been identified for PPAR $\alpha$ /RXR $\alpha$  heterodimers in basal  
6 core and preS1 promoters, and in Enh1 region. Overexpression of PPAR $\alpha$ /RXR $\alpha$  in  
7 Huh-7 cells stimulates pg-RNA but did not influence preC-RNA. Similarly, HNF4 $\alpha$ ,  
8 which also binds to response elements in the basal core promoter, in Enh1 and Enh2  
9 regions, inhibits preC-RNA but increases significantly pg-RNA synthesis. Recently,  
10 RXR $\alpha$ , which forms heterodimer with these nuclear receptors, was shown to  
11 participate to the modulation of HBV replication (10).

12 The bile acid (BA) nuclear receptor FXR $\alpha$ , mainly as a heterodimer with RXR $\alpha$   
13 (FXR $\alpha$ /RXR $\alpha$ ), can bind to two sequences on the cccDNA; one in the basal core  
14 promoter (Cp) and the other one in the Enh2 region (11). In cells of non-hepatic  
15 origin, expression of FXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  and activation by ligands is sufficient to induce the  
16 expression of a luciferase gene under the Cp control or HBV mRNAs after  
17 transfection of 1.3xHBV (11,12). Interestingly, FXR $\alpha$  agonists preferentially stimulate  
18 synthesis of pg-RNA over preC-RNA (11). Treatment of HBV transgenic mice with  
19 cholic acid (CA), a mild endogenous FXR $\alpha$  ligand, increased secretion of HBeAg and  
20 transcription of 3.5 kb RNAs by roughly a factor 2 with variations between male and  
21 female (13). These variations are in the same order than CA-induced variations of  
22 BSEP and SHP expression, two FXR $\alpha$  target genes. Further linking HBV infection  
23 and BA metabolism, the main liver BA transporter, NTCP, was recently identified as  
24 HBV entry receptor (14). Competition between HBsAg and BA for NTCP (15,16) may  
25 explain intra-hepatic increased expression of FXR $\alpha$ , APOA1, and CYP7A1 mRNA  
26 and decreased expression of SHP mRNA in HBV infected individuals, which may  
27 result from lower FXR $\alpha$  activation by endogenous BA (17). In addition, we recently  
28 showed the reciprocal consequences between FXR $\alpha$  activation and HBV infection in  
29 differentiated HepaRG (dHepaRG) and primary human hepatocytes (PHH), two cell  
30 models supporting HBV replication. Whereas HBV infection is correlated with  
31 modification of expression of FXR $\alpha$  target genes compatible with decreased FXR $\alpha$   
32 activity, treatment with FXR $\alpha$  agonists conversely repressed HBV cccDNA formation  
33 and transcription (18). Overall these studies suggest that BA metabolism and HBV  
34 life cycle are tightly interdependent.

35 To better decipher the roles of FXR $\alpha$  in HBV replication, using dHepaRG cell model,  
36 we showed that FXR $\alpha$  is a proviral factor which absence decreases cccDNA pool  
37 size and impedes viral RNA transcription and virus secretion. In addition, the effect of  
38 a synthetic FXR $\alpha$  agonist on HBV replication was tested in C3H/HeN mice  
39 transduced with a recombinant rAAV-HBV vector, a model of chronic HBV infection  
40 (19).

## 41 42 43 44 45 **Materials and methods**

### 46 47 *Cell culture, HBV production and infection*

48 Details for cells culture are described in Supplementary methods.

49 HBV wild-type (HBVwt) particles were produced from stably transfected HepAD38  
50 cell line and HBV delta HBx (HBV $\Delta$ HBx) particles from stably transfected HepG2  
51 H1.3 $\Delta$ HBx (kindly provided by Ulrike Protzer). HBV particles were concentrated from  
52 the clarified supernatant (0.45  $\mu$ m filter) by overnight precipitation with 5% PEG 8000  
53 at 4°C before a centrifugation of 1 hour at 4500 rpm at 4°C. Viral particles were  
54 quantified by qPCR using rcDNA primers (Supplementary Table 2). dHepaRG cells  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 were infected as previously described (18) with normalized amounts of virus using  
4  $10^2$  and  $10^3$  genome equivalents per cell for HBVwt and HBV $\Delta$ HBx, respectively.  
5

#### 6 *Lentiviral vectors and shRNA*

7 Lentiviral vectors, hairpin shRNA sequences (Supplementary Table 1) and HepaRG  
8 transduction experimental details are described in Supplementary methods.  
9

#### 10 *HBs and HBe antigens measurements*

11 HBs and HBe antigens secreted in cells supernatant were quantified, after required  
12 dilutions, on the Architect apparatus (Abbott Laboratories, Rungis, France) with  
13 HBsAgII and HBeAg kits and on Mini Vidas apparatus (bioMérieux, France) with  
14 Vidas HBs and Vidas HBE/HBET kits according to manufacturer's protocol.  
15

#### 16 *Analysis of viral DNA*

17 Secreted DNA was extracted from cells supernatant by using the easyMAG sample  
18 extraction platform (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) following manufacturer  
19 recommendations. Eluates were directly used for quantification of secreted viral DNA  
20 by qPCR experiments using primers for rcHBV DNA (Supplementary Table 2). For  
21 absolute quantifications, the viral genome equivalent copies were calculated based  
22 on a standard curve generated with known copy numbers of a plasmid containing an  
23 HBV genome (Genbank accession number U95551).  
24  
25

#### 26 *Analysis of viral and cellular RNA*

27 Total RNA was prepared using NucleoSpin RNA Plus (Macherey-Nagel). After DNA  
28 digestion with TURBO DNase (Ambion), 1500 ng RNA were reverse-transcribed  
29 using High-Capacity RNA-to-cDNA kit (Thermo Fisher Scientific).  
30  
31

#### 32 *Quantification of cccDNA*

33 A two-step protocol was used for cccDNA quantification, inspired by Jun-Bin *et al.*  
34 (20) with several important modifications described in Supplementary methods.  
35

#### 36 *Animal study*

37 AAV2/8-HBV vector, a recombinant AAV2/8 vector carrying 1.2 copies of the HBV  
38 genome (genotype D) was constructed. Virus stocks were produced and titrated by  
39 the Plateforme de Thérapie Génique in Nantes, France (INSERM U1089), as  
40 described in (21). The vector stocks were titrated as virus genomes equivalent (GE)  
41 and focus forming units (FFU) per milliliter,  $7.2 \times 10^{12}$  and  $3.8 \times 10^9$  respectively and  
42 stored at  $-80^\circ\text{C}$  until use.  
43

44 Female wild-type C3H/HeN mice were purchased from Charles River Laboratories.  
45 Mice were maintained / housed in A1 for adaptation / acclimatized until the age of 7  
46 or 12 weeks. All experiments with HBV infections were performed in A3 animal  
47 facility. All experiments were performed in accordance with the European Union  
48 guidelines for approval of the protocols by the local ethics committee (Authorization  
49 Agreement C2EA-15, "Comité Rhône-Alpes d'Ethique pour l'Expérimentation  
50 Animale", Lyon, France - APAFIS# 3630-2015121014033616 v2).  
51

52 Mice were infected with the indicated titers of AAV2/8-HBV vector by single  
53 intravenous injections (retro-orbital venous sinus) under isoflurane anaesthesia.  
54 When indicated, mice underwent gavage, 6 days a week for the indicated time, with  
55 FXR $\alpha$  synthetic agonist GW4064 (50mg/kg/day) dissolved in water with 1%  
56 carboxymethylcellulose 1%Tween 80 or vehicle only. Blood was collected by retro-  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 orbital venous plexus puncture no more than once a week. Sera were stored at -  
4 20°C. At sacrifice, livers were snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until  
5 RNA isolation.

6 Details on chemicals and specific mouse qRT-PCR are given in Supplementary  
7 methods.  
8

## 9 10 **Results**

### 11 *FXR $\alpha$ is a proviral factor for HBV.*

12 We previously demonstrated that treatment with FXR $\alpha$  agonists induced a strong  
13 inhibition of its own expression in dHepaRG or PHH cells (18), in line with studies in  
14 mice treated with endogenous agonists, CA or taurocholate (13,22,23). We thus  
15 wondered if repression of FXR $\alpha$  expression by agonists might be responsible, at  
16 least in part, of the anti-HBV activity of FXR $\alpha$  agonists. HepaRG cells were  
17 transduced with lentiviruses expressing either a non-specific control (shCtrl) or  
18 FXR $\alpha$ -targeting shRNA (shFXR $\alpha$ ) and maintained under puromycin selection  
19 throughout the differentiation process. Transduction did not alter differentiation into  
20 hepatocyte-like cells as determined by the expression of two genes that define  
21 dHepaRG (24). Indeed, shFXR $\alpha$ , shCtrl and mock-transduced dHepaRG cells  
22 secreted albumin at similar levels (623 +/- 4.9, 642 +/- 5.3, and 665 +/- 7.6  $\mu$ g/mL  
23 respectively) and NTCP mRNA expression did not vary between these conditions  
24 (Fig. 1A and 1B). In shFXR $\alpha$ -transduced cells, FXR $\alpha$  mRNA expression was  
25 decreased by 85% at time of infection (Fig. 1A). Silencing was maintained till end of  
26 experiment (Fig. 1B and 1D). Moreover, BSEP expression was decreased and  
27 CYP7A1 expression was increased in shFXR $\alpha$ -transduced cells, as expected for  
28 genes that are respectively positively and negatively controlled by FXR $\alpha$  (Fig. 1A and  
29 1B). These results indicate that FXR $\alpha$  silencing efficiently reduced its basal activity.  
30 Intracellular cccDNA and pg/preC-RNA as well as secreted rcDNA and HBsAg levels  
31 were all significantly lower, in shFXR $\alpha$  than in shCtrl conditions, with reduction range  
32 of 40 to 70% (Fig. 1C). Overall these results indicate that cccDNA pool size and  
33 transcriptional activity are dependent on FXR $\alpha$  in dHepaRG cells.  
34  
35  
36

### 37 *FXR $\alpha$ agonist enhances effects of FXR $\alpha$ silencing only for a subset of HBV markers.*

38 Using same infection protocol and monitoring in shFXR $\alpha$  and shCtrl dHepaRG cells,  
39 we tested the effect of FXR $\alpha$  agonist GW4064, a specific and potent nonsteroidal  
40 agonist (25), on the expression of HBV markers and the cellular genes BSEP and  
41 FXR $\alpha$ . As expected, agonist treatment significantly reduced FXR $\alpha$  mRNA expression  
42 by 70% in shCtrl-dHepaRG, but did not further repress the expression of FXR $\alpha$  in  
43 shFXR $\alpha$ -dHepaRG cells (Fig. 2A). BSEP expression was lower in shFXR $\alpha$ -dHepaRG  
44 cells than in shCtrl-dHepaRG cells, nevertheless GW4064 increased BSEP  
45 expression in similar proportions in both conditions, suggesting that residual FXR $\alpha$  in  
46 shFXR $\alpha$ -dHepaRG cells was functional and sufficient to respond to the agonist, at  
47 least for one classical FXR $\alpha$  target gene.  
48

49 Regarding HBV, agonist treatment dramatically reduced expression of pg/preC-RNA,  
50 rcDNA, cccDNA, HBsAg and HBeAg in shCtrl dHepaRG cells (Fig. 2 B – D), as  
51 reported in a previous study (18). GW4064 also reduced expression of these viral  
52 markers in shFXR $\alpha$ -dHepaRG cells but with important differences depending on the  
53 markers considered. FXR $\alpha$  agonist reduced to very similar levels pg/preC-RNA  
54 expression and rcDNA secretion in both conditions. The agonist-induced drops of  
55 rcDNA and pg/preC-RNA were then higher in shCtrl than in shFXR $\alpha$  dHepaRG cells,  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 70% versus 30% and 84% versus 70%, respectively. In contrast, GW4064 repressed  
4 cccDNA and HBsAg expression in similar proportions in shFXR $\alpha$  and shCtrl  
5 dHepaRG cells, leading to an additive effect of FXR $\alpha$  silencing and agonist  
6 treatment. Consequently, expression of cccDNA and HBsAg reached lower levels in  
7 treated shFXR $\alpha$  dHepaRG than in treated control cells. HBeAg variations followed  
8 that of HBsAg and cccDNA. These data suggest that the proviral effect of FXR $\alpha$  on  
9 HBV replication is repressed by the FXR $\alpha$  agonist GW4064 in at least two different  
10 manners. One is more sensitive to FXR $\alpha$  modification by its ligand than to its  
11 expression level alone. The other depends on both FXR $\alpha$  availability and ligand-  
12 induced modifications, with additive effects.

13  
14  
15 *The effect of FXR $\alpha$  agonist differs when given at an early or a late step of HBV*  
16 *infection*

17 We next wanted to determine the impact of treatment with FXR agonist GW4064 at  
18 different time points in dHepaRG cells infected by HBV. First, the kinetic of the effect  
19 of short GW4064 treatments was evaluated in dHepaRG cells. Treatment with  
20 GW4064 for two days (Fig. S1A) or 9 days (Fig. S1B) significantly reduced FXR $\alpha$   
21 protein and mRNA expression. However, a 9-day treatment increased to a lower  
22 extent BSEP mRNA expression than a 2-day treatment, likely as a result of the  
23 sustained repression of FXR $\alpha$  expression. FXR $\alpha$  or BSEP expression returned to  
24 pre-treatment levels 7 days after drug withdrawal (Fig. S1C). Shorter four-hour  
25 treatment also repressed FXR $\alpha$  mRNA expression at day 2 post-treatment (Fig. S2).  
26 BSEP mRNA expression increased as early as day 1 and was maximal at day 2  
27 before returning to its basal level at day 7 post-treatment. We next tested in HBV-  
28 infected dHepaRG cells the impact of short 4-hour treatments given at days 1, 2, 6 or  
29 9 p.i. on different markers of HBV infection which were quantified at day 11 p.i. (Fig.  
30 3A). A decrease of cccDNA was observed when treatment was given at day 1 p.i.  
31 and reached a significant 50% drop when cells were exposed at day 2, whereas  
32 treatments at later days had no impact on cccDNA pool size (Fig. 3B). Secretion of  
33 HBsAg and HBeAg was affected whenever treatments were given with reduction that  
34 peaked when cells were exposed at day 2. Treatment with GW4064 at days 6 and 9  
35 p.i. also reduced HBsAg and HBeAg secretion but to a lower extent. Interestingly,  
36 early exposure of infected cells at day 2 p.i. reduced rcDNA secretion by 53% but,  
37 contrary to other markers of infection, this strong inhibitory effect on rcDNA was  
38 maintained when treatment with FXR $\alpha$  agonist was applied at days 6 and 9 p.i. (Fig.  
39 3B). Similar variations of HBV antigens and RNA or DNA expression were observed  
40 when infected cultures were exposed to 4-day treatments during the first 4 or the last  
41 4 days of the viral replication cycle (Fig. S3A and S3B). Overall, these data indicate  
42 that FXR $\alpha$  agonist differently impacts HBV markers when given at an early or a late  
43 step of the virus life cycle.

44  
45  
46  
47 *FXR $\alpha$  modulates expression of a subset of HBV markers in an HBx-dependent*  
48 *manner.*

49 HBx is an essential viral factor in initiating and maintaining HBV transcription after  
50 infection (6). A direct interaction between HBx third  $\alpha$ -helix and FXR $\alpha$  activation  
51 function 1 domain (AF1) has been described (26). Therefore, we hypothesized that  
52 proviral activities of FXR $\alpha$  and HBx might be interdependent, at least regarding the  
53 effect of FXR $\alpha$  on HBV transcription. To check this hypothesis, dHepaRG cells were  
54 infected with HBVwt or HBV $\Delta$ HBx and treated or not with GW4064 for 9 days. The  
55 absence of HBx did not modify mRNA expression variations of FXR $\alpha$  and its target  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 genes APOA1 and BSEP in response to GW4064 treatment (Fig. S4). As expected  
4 (6,27), secretion of rcDNA, HBsAg and HBeAg were markedly diminished when cells  
5 were infected with HBV $\Delta$ HBx compared to HBVwt (Fig. 4A and 4B). Regarding the  
6 impact of GW4064 treatment in the presence or absence of HBx, different outcomes  
7 were observed on HBV markers. First, GW4064 treatment decreased similarly  
8 cccDNA pool in cells infected by HBVwt and HBV $\Delta$ HBx, by 41% and 45%  
9 respectively, indicating that agonist-induced decrease of cccDNA pool was HBx-  
10 independent (Fig. 4B). On the opposite, treatment with agonist reduced differently  
11 pg/preC RNA synthesis by 88% and 40% in cells infected with HBVwt and  
12 HBV $\Delta$ HBx, respectively, and rcDNA secretion by 91% and 42%, respectively (Fig.  
13 4A). GW4064 treatment also reduced HBsAg secretion by 63% and 48% in HBVwt  
14 and HBV $\Delta$ HBx-infected cells, respectively (Fig. 4B). However, as the diminution of  
15 rcDNA and HBsAg secretion was comparable to that of cccDNA in HBV $\Delta$ HBx-  
16 infected cells, the reduction of the cccDNA pool size might be responsible of these  
17 rcDNA and HBsAg expression diminutions. With respect to HBeAg, GW4064 also  
18 decreased similarly the secretion in HBVwt and HBV $\Delta$ HBx-infected cells, suggesting  
19 that the effect of agonist was also HBx independent. Though, HBeAg levels fell just  
20 below the dosage detection limit in treated dHepaRG and in absence of HBx, likely  
21 underestimating the reduction proportion and conclusion should be taken with  
22 caution. Overall, these data suggest that the proviral effect of FXR $\alpha$  on rcDNA  
23 secretion and on HBsAg secretion is actually dependent on HBx while the effect on  
24 cccDNA, and likely on HBe, is not.  
25  
26

27  
28 *Effect of the FXR $\alpha$  agonist GW4064 on HBV replication in a mouse model of HBV*  
29 *infection.*

30 We next wanted to determine the impact of FXR $\alpha$  ligands in an *in vivo* model of HBV  
31 infection. Interestingly, it has been shown that hydrodynamic injection of HBV  
32 expression plasmid pAAV/HBV1.2 (genotype A) in C3H/HeN mice led to chronic  
33 infection in young mice and to transient infection in adult mice (28). We first tested  
34 whether a recombinant AAV2/8 vector carrying one HBV genome (genotype D)  
35 (rAAV2/8-HBV) (21) also induced different HBV infection evolutions in C3H/HeN  
36 mouse strain depending on age at transduction and on inoculum size. In 7-week old  
37 mice injected intravenously with  $1.10^{10}$ ,  $5.10^{10}$  or  $2.10^{11}$  GE, serum rcDNA titers  
38 seemed to reach a plateau as soon as day 7 post-transduction and remained stable  
39 over 3 months in a range between  $3.10^7$  and  $2.10^8$  copies/mL (Fig. S5). In 12-week  
40 old mice, injection of  $2.10^{11}$  GE also led to stable viral loads around  $1.10^8$  copies/mL  
41 between days 7 and 91 post-transduction (Fig. S5). However, injection of  $5.10^{10}$  GE  
42 was followed by lower viral loads at day 7 and 35 post-transduction than in young  
43 mice (-0.5 and -2 log<sub>10</sub> respectively). An important viral load drop was also observed  
44 in the only survival mouse out of the 3 mice that received  $1.10^{10}$  GE. Viral loads then  
45 resumed to day 7-level at day 91. Evolution of plasma HBsAg titers was similar to  
46 that of rcDNA (Fig. S5), except for the highest inoculum that led to a continuous  
47 decline of HBsAg over time. In this model, spontaneous resolution of infection did not  
48 occur in adult mice as observed after hydrodynamic injection. Nevertheless, evolution  
49 of HBV infection also differed with age at infection for inoculum at or below  $5.10^{10}$   
50 HBV GE, with a transient control of infection in adult mice that did not occur in young  
51 mice (Fig. 5).  
52

53 GW4064 solubility is low with poor oral bioavailability (25). Engagement of FXR $\alpha$  by  
54 oral GW4064 was therefore tested by monitoring in C3H/HeN adult mice the  
55 expression of FXR $\alpha$  dependent genes after gavage with GW4064 50mg/kg/day, once  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 a day for 2 days. Mice were sacrificed 6 hours after the last gavage. As expected  
4 (Fig. S6), treatment significantly increased hepatic mRNA expression of SHP and  
5 decreased that of CYP7A1, two genes that are positively and negatively controlled by  
6 FXR $\alpha$ , respectively (29). GW4064 treatment also tended to decrease FXR $\alpha$   
7 expression, as previously reported for mice treated with FXR $\alpha$  agonists (13,22),  
8 however this effect was only close to statistically significant threshold (p=0.076).  
9 Overall these results confirmed that oral GW4064 treatment effectively engaged  
10 FXR $\alpha$  in our model.

11 Seven and 12-week old C3H/HeN mice were then injected with  $2.10^{10}$  rAAV2/8-HBV  
12 GE and treated daily with 50mg/kg/day GW4064 or vehicle, 6 days per week for 28  
13 days. Treatment had no effect on mouse weight or growth (Fig. S7). For the small  
14 blood samples volume that could be collected, secreted rcDNA and viral antigens  
15 could not be quantified at the same time points post-transduction (Fig. 6). Treatment  
16 with GW4064 had no effect on rcDNA or HBsAg titers in the blood of young mice,  
17 which remained stable from day 7 to day 28 in both treated and control mice (Fig.  
18 6A). Interestingly, in mock-treated 12-week old mice, rcDNA and HBsAg titers tended  
19 to decrease at day 14 and day 21 compared to day 7 without reaching statistically  
20 significant variations before rebounding to day 7 levels at day 28 (Fig. 6B). HBeAg  
21 titers increased and reached a plateau at day 14. On the opposite, rcDNA and  
22 HBsAg titers were similar at day 7 in GW4064-treated and mock-treated 12-week old  
23 mice but decreased more importantly and remained significantly lower at day 21 and  
24 day 28 in GW4064-treated mice compared to mock-treated mice (mean rcDNA  
25 variation: -0.52 and -0.93 log<sub>10</sub> ; mean HBsAg variation -0.89 versus -0.73 log<sub>10</sub>,  
26 at day 21 and 28 respectively, Fig. 6B). In contrast, HBeAg titers evolution did not differ  
27 between treated or control mice and was similar to that observed in young mice.  
28 In conclusion, FXR $\alpha$  ligand GW4064 inhibits rcDNA and HBsAg production, but not HBe  
29 secretion, in C3H/HeN adult mice infected with a recombinant AAV2/8-HBV vector.  
30  
31

## 32 Discussion

33  
34  
35 The proviral effect of FXR $\alpha$  on HBV infection and its abolition by agonist are the main  
36 findings of this study. In dHepaRG cells, the cccDNA pool size is affected both by  
37 reduction of FXR $\alpha$  expression and by ligand-induced modifications of FXR $\alpha$  function  
38 with additive effects. However, FXR $\alpha$  agonist reduces cccDNA pool size only when  
39 given early during the replication cycle, when cccDNA completion and formation take  
40 place in dHepaRG (30). Our data also suggest that this reduction occurs in an HBx-  
41 independent manner. In contrast, FXR $\alpha$  agonist inhibits pg/preC-RNA synthesis and  
42 rcDNA secretion throughout the viral replication cycle, including the late steps when  
43 cccDNA pool is established and transcription is active. This inhibition is HBx-  
44 dependent, which suggests conversely that the pro-transcriptional activity of HBx  
45 may depend in part on FXR $\alpha$  presence. In addition, the pg/preC-RNA expression  
46 level and subsequent rcDNA synthesis are highly impacted by the agonist effect on  
47 FXR $\alpha$  activation state since the same level of inhibition can be obtained in shCtrl-  
48 dHepaRG and shFXR $\alpha$ -dHepaRG. This suggests that FXR $\alpha$  proviral action can be  
49 almost totally abrogated by agonist, even when FXR $\alpha$  expression is initially at a basal  
50 level. Regarding the modulation of HBsAg and HBeAg expression, the role of FXR $\alpha$   
51 is even more complex. As for cccDNA, FXR $\alpha$  seems to regulate HBeAg expression in  
52 an HBx-independent manner, whereas the impact of FXR $\alpha$  on HBsAg production  
53 appears partially influenced by HBx. Moreover, FXR $\alpha$  agonists still inhibit secretion of  
54 both antigens even when given late at day 9 p.i., but less efficiently than when given  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 early; this inhibition profile thus differs from that observed for cccDNA or rcDNA.  
4 Overall, depending on the step of the viral cycle, HBV markers are differently  
5 impacted by the reduction of FXR $\alpha$  expression, by agonist-induced modifications of  
6 FXR $\alpha$  functions, and finally by HBx interference with FXR $\alpha$ .

7 Based on the results of this study, it appears that FXR $\alpha$  has at least two main proviral  
8 activities. First, FXR $\alpha$  is likely involved in cccDNA formation and/or maintenance  
9 during the early phase of the viral cycle. This function is HBx-independent but  
10 consequently impacts expression of all HBV markers. Interestingly, a recent  
11 publication showed the rapid recruitment of FXR $\alpha$  to damaged chromatin depending  
12 on its own DNA-binding domain (31), raising the hypothesis of a so far unsuspected  
13 function of FXR $\alpha$  in DNA repair. Such function might be responsible of the positive  
14 role of FXR $\alpha$  in rcDNA repair and cccDNA completion. Notably, the two FXREs  
15 identified on the HBV genome are localized in the region where rcDNA nicks and  
16 gaps have to be repaired. Alternatively, FXR $\alpha$  may favour cccDNA maintenance by  
17 unknown mechanisms.

18 Besides its role on cccDNA pool size, FXR $\alpha$  also modulates transcription of the  
19 cccDNA. Inhibition of cccDNA transcription by FXR $\alpha$  agonist treatment may directly  
20 result from agonist binding to FXR $\alpha$  and alteration of its functions. This would be a  
21 privileged mechanism of action for pg-RNA and rcDNA regulation. FXR $\alpha$  may recruit  
22 other cellular factors in the Enh2/Cp region, directly or through its binding to HBx,  
23 favoring pg-RNA transcription whereas FXR $\alpha$  agonist may destabilize these  
24 interactions. Another hypothesis is that FXR $\alpha$ , which is a common interactant of HBx  
25 and SIRT1, may thus, depending on activation by ligand, regulate the balance  
26 between HBx and SIRT1 on cccDNA, a key parameter controlling HBV transcription  
27 (32). A similar process might exist with SIRT3 (33). The distinct regulation of rcDNA  
28 and HBeAg secretion by FXR $\alpha$  agonist is surprising and suggests that pg-RNA and  
29 preC-RNA are differentially regulated by FXR $\alpha$ . Interestingly, despite the fact that  
30 transcription of both pg-RNA and preC-RNA is controlled by the same Enh2/Cp  
31 region and that their transcription-starting sites are very close, a differential regulation  
32 of these two RNAs by other nuclear receptors has been previously reported (9).

33 FXR $\alpha$  expression and status may thus represent a balance tuning HBV replication.  
34 BA metabolic pathway is regulated by a complex interplay between hormones,  
35 membrane transport proteins, transcription factors expressed in the liver and the  
36 intestine, and bacteria within the gut microbiota (29) that matures slowly during the  
37 first years of life (34–36). If indeed FXR $\alpha$  expression level and activation are critical  
38 for HBV, any variation of this equilibrium depending on cell line's origin or following  
39 age-related BA and FXR $\alpha$  physiology changes may have consequences on HBV  
40 replication. For instance, in Huh7-hNTCP and HepG2-hNTCP cell lines, FXR $\alpha$   
41 agonists increase surprisingly FXR $\alpha$  expression at both mRNA and protein levels  
42 with outcomes on HBV replication that differ from that of dHepaRG or PHH (data not  
43 shown).

44 To examine the effect of FXR $\alpha$  agonist treatment and age on the evolution of HBV  
45 infection, we infected C3H/HeN mice with a recombinant AAV2/8-HBV. This model  
46 was chosen for two main reasons. First, it has been shown in this model that HBV  
47 infection outcomes vary with age at which mice were infected by hydrodynamic  
48 injection of HBV genome construct (28). Secondly, the BA entero-hepatic cycle is not  
49 disrupted in C3H/HeN mice as it is in mice with humanized liver, an otherwise widely  
50 used model of HBV infection (22). As hydrodynamic injection is not allowed for  
51 ethical concerns, the model was accordingly adapted with the use of rAAV2/8-HBV  
52 vector (21). In this model, with a selected rAAV2/8-HBV inoculum, we observed  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 variations of HBV viral load and HBs antigenemia between young and adult mice.  
4 These variations were not as drastic as those observed after hydrodynamic injection.  
5 This discrepancy might result from the difference in HBV genotypes (A versus D) or  
6 between transfection and transduction to induce infection. Indeed, infection with AAV  
7 lead to formation of multiple AAV concatemers and continuous integration of these  
8 forms in cell genome (37). Accumulation of rAAV2/8-HBV may permit HBV  
9 expression at higher level and impair the control of infection. In young mice a steady  
10 and high level of replication over the three months of experiment was observed, while  
11 in adult mice rcDNA and HBsAg markers followed a biphasic evolution characterized  
12 by an initial decline before a rebound to initial levels. Four-week treatment with FXR $\alpha$   
13 agonist had no effect on HBV evolution in young mice but deepened the initial  
14 decline of rcDNA and HBsAg titers and prevented the subsequent rebound in adult  
15 mice. These results suggest that maturation of some physiological pathways impacts  
16 infection outcomes. BA metabolism may be one of those pathways since it matures  
17 slowly with age and because modulation of FXR $\alpha$  activity influences infection  
18 outcomes in adult mice only. Moreover, in mice with humanized liver, in which BA  
19 metabolism and FXR $\alpha$  activity are deregulated due to the lack of FGF19 signaling  
20 (22), treatment of HBV infected mice with an FXR $\alpha$  agonist did not modify the course  
21 of infection (data not shown). As observed in dHepaRG model, evolution of HBeAg  
22 secretion in infected adult mice treated with an FXR $\alpha$  agonist differed from that of  
23 HBsAg and rcDNA. Indeed, HBeAg titers evolved similarly in young or adult mice,  
24 treated or not. The absence of inhibitory effect of FXR $\alpha$  agonist on HBeAg in mice  
25 reinforces the hypothesis that preC-RNA transcription is differentially regulated by  
26 FXR $\alpha$  compared to pg-RNA transcription.  
27 Despite its limitations, C3H/HeN mice model infected with recombinant AAV-HBV  
28 vectors might thus be useful to further study the role of BA metabolism and of its  
29 evolution with age on HBV infection.  
30  
31

### 32 33 **Acknowledgment**

34  
35 We acknowledge the contribution of AniRA Biosafety Level-3 (BSL-3) laboratory of  
36 SFR Biosciences Gerland-Lyon Sud (AMS3444/US8).  
37

### 38 39 **References**

- 40  
41 1. Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk RT, Krause G, Ott JJ. Estimations of  
42 worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of  
43 data published between 1965 and 2013. *The Lancet*. 2015;386:1546–1555.  
44 2. Lampertico P, Agarwal K, Berg T, Buti M, Janssen HLA, Papatheodoridis G, et  
45 al. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus  
46 infection. *J. Hepatol*. 2017;67:370–398.  
47 3. Nassal M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a  
48 cure of chronic hepatitis B. *Gut*. 2015;gutjnl-2015-309809.  
49 4. Nassal M. Hepatitis B viruses: Reverse transcription a different way. *Virus*  
50 *Res*. 2008;134:235–249.  
51 5. Hong X, Kim ES, Guo H. Epigenetic regulation of hepatitis B virus covalently  
52 closed circular DNA: Implications for epigenetic therapy against chronic hepatitis B.  
53 *Hepatology*. 2017;66:2066–2077.  
54 6. **Lucifora J, Arzberger S, Durantel D, Belloni L, Strubin M, Levrero M, et al.**  
55 **Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after**  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 infection. *J. Hepatol.* 2011;55:996–1003.
- 4 7. Quasdorff M, Protzer U. Control of hepatitis B virus at the level of transcription.  
5 *J. Viral Hepat.* 2010;17:527–536.
- 6 8. Protzer U. Viral hepatitis: The bumpy road to animal models for HBV infection.  
7 *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2017;14:227–228.
- 8 9. Yu X, Mertz JE. Differential regulation of the pre-C and pregenomic promoters  
9 of human hepatitis B virus by members of the nuclear receptor superfamily. *J. Virol.*  
10 1997;71:9366–9374.
- 11 10. **Song M, Sun Y**, Tian J, He W, Xu G, Jing Z, et al. Silencing Retinoid X  
12 Receptor Alpha Expression Enhances Early-Stage Hepatitis B Virus Infection In Cell  
13 Cultures. *J. Virol.* 2018;92:e01771-17.
- 14 11. Ramiere C, Scholtes C, Diaz O, Icard V, Perrin-Cocon L, Trabaud M-A, et al.  
15 Transactivation of the Hepatitis B Virus Core Promoter by the Nuclear Receptor  
16 FXR{alpha}. *J Virol.* 2008;82:10832–10840.
- 17 12. Curtil C, Enache LS, Radreau P, Dron A-G, Scholtès C, Deloïre A, et al. The  
18 metabolic sensors FXR $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ , and SIRT1 cooperatively regulate hepatitis B  
19 virus transcription. *FASEB J.* 2014;28:1454–1463.
- 20 13. Reese VC, Moore DD, McLachlan A. Limited Effects of Bile Acids and Small  
21 Heterodimer Partner on Hepatitis B Virus Biosynthesis In Vivo. *J. Virol.*  
22 2012;86:2760–2768.
- 23 14. **Yan H, Zhong G**, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, et al. Sodium taurocholate  
24 cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus.  
25 *eLife.* 2012;1:e00049.
- 26 15. Yan H, Peng B, Liu Y, Xu G, He W, Ren B, et al. Viral Entry of Hepatitis B and  
27 D Viruses and Bile Salts Transportation Share Common Molecular Determinants on  
28 Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide. *J. Virol.* 2014;88:3273–3284.
- 29 16. Slijepcevic D, Kaufman C, Wichers CGK, Gilgioni EH, Lempp FA, Duijst S, et  
30 al. Impaired uptake of conjugated bile acids and hepatitis b virus pres1-binding in  
31 na+ -taurocholate cotransporting polypeptide knockout mice. *Hepatology.*  
32 2015;62:207–219.
- 33 17. **Oehler N, Volz T**, Bhadra OD, Kah J, Allweiss L, Giersch K, et al. Binding of  
34 hepatitis B virus to its cellular receptor alters the expression profile of genes of bile  
35 acid metabolism. *Hepatology. Baltim. Md.* 2014;60:1483–1493.
- 36 18. Radreau P, Porcherot M, Ramière C, Mouzannar K, Lotteau V, André P.  
37 Reciprocal regulation of farnesoid X receptor  $\alpha$  activity and hepatitis B virus  
38 replication in differentiated HepaRG cells and primary human hepatocytes. *FASEB J.*  
39 2016;30:201500134.
- 40 19. Lucifora J, Salvetti A, Marniquet X, Mailly L, Testoni B, Fusil F, et al. Detection  
41 of the hepatitis B virus (HBV) covalently-closed-circular DNA (cccDNA) in mice  
42 transduced with a recombinant AAV-HBV vector. *Antiviral Res.* 2017;145:14–19.
- 43 20. Jun-Bin S, Zhi C, Wei-Qin N, Jun F. A quantitative method to detect HBV  
44 cccDNA by chimeric primer and real-time polymerase chain reaction. *J. Virol.*  
45 2003;77:45–52.
- 46 21. Dion S, Bourguine M, Godon O, Levillayer F, Michel M-L. Adeno-Associated  
47 Virus-Mediated Gene Transfer Leads to Persistent Hepatitis B Virus Replication in  
48 Mice Expressing HLA-A2 and HLA-DR1 Molecules. *J. Virol.* 2013;87:5554–5563.
- 49 22. Naugler WE, Tarlow BD, Fedorov LM, Taylor M, Pelz C, Li B, et al. Fibroblast  
50 Growth Factor Signaling Controls Liver Size in Mice With Humanized Livers.  
51 *Gastroenterology.* 2015;149:728–740.e15.
- 52 23. Wang L, Lee Y-K, Bundman D, Han Y, Thevananther S, Kim C-S, et al.
- 53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 Redundant Pathways for Negative Feedback Regulation of Bile Acid Production.  
4 Dev. Cell. 2002;2:721–731.

5 24. Guillouzo A, Corlu A, Aninat C, Glaise D, Morel F, Guguen-Guillouzo C. The  
6 human hepatoma HepaRG cells: A highly differentiated model for studies of liver  
7 metabolism and toxicity of xenobiotics. Chem. Biol. Interact. 2007;168:66–73.

8 25. Maloney PR, Parks DJ, Haffner CD, Fivush AM, Chandra G, Plunket KD, et al.  
9 Identification of a chemical tool for the orphan nuclear receptor FXR. J. Med. Chem.  
10 2000;43:2971–2974.

11 26. Niu Y, Xu M, Slagle BL, Huang H, Li S, Guo GL, et al. Farnesoid X receptor  
12 ablation sensitizes mice to hepatitis b virus X protein–induced hepatocarcinogenesis.  
13 Hepatology. 2017;65:893–906.

14 27. Rivièrè L, Gerossier L, Ducroux A, Dion S, Deng Q, Michel M-L, et al. HBx  
15 relieves chromatin-mediated transcriptional repression of hepatitis B viral cccDNA  
16 involving SETDB1 histone methyltransferase. J. Hepatol. 2015;63:1093–1102.

17 28. **Chou H-H, Chien W-H**, Wu L-L, Cheng C-H, Chung C-H, Horng J-H, et al.  
18 Age-related immune clearance of hepatitis B virus infection requires the  
19 establishment of gut microbiota. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2015;112:2175–2180.

20 29. Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B. Role of Bile Acids and Bile  
21 Acid Receptors in Metabolic Regulation. Physiol Rev. 2009;89:147–191.

22 30. Hantz O, Parent R, Durantel D, Gripon P, Guguen-Guillouzo C, Zoulim F.  
23 Persistence of the hepatitis B virus covalently closed circular DNA in HepaRG human  
24 hepatocyte-like cells. J. Gen. Virol. 2009;90:127–135.

25 31. Izhar L, Adamson B, Ciccìa A, Lewis J, Pontano-Vaites L, Leng Y, et al. A  
26 Systematic Analysis of Factors Localized to Damaged Chromatin Reveals PARP-  
27 Dependent Recruitment of Transcription Factors. Cell Rep. 2015;11:1486–1500.

28 32. Belloni L, Pollicino T, De Nicola F, Guerrieri F, Raffa G, Fanciulli M, et al.  
29 Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation  
30 of cccDNA function. Proc. Natl. Acad. Sci. 2009;106:19975–19979.

31 33. Ren J-H, Hu J-L, Cheng S-T, Yu H-B, Wong VKW, Law BYK, et al. SIRT3  
32 restricts HBV transcription and replication via epigenetic regulation of cccDNA  
33 involving SUV39H1 and SETD1A histone methyltransferases. Hepatology. 2018; doi:  
34 10.1002/hep.29912

35 34. Bourlieu C, Ménard O, Bouzerzour K, Mandalari G, Macierzanka A, Mackie  
36 AR, et al. Specificity of Infant Digestive Conditions: Some Clues for Developing  
37 Relevant In Vitro Models. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2014;54:1427–1457.

38 35. de Belle RC, Vaupshas V, Vitullo BB, Haber LR, Shaffer E, Mackie GG, et al.  
39 Intestinal absorption of bile salts: immature development in the neonate. J. Pediatr.  
40 1979;94:472–476.

41 36. Watkins JB, Ingall D, Szczepanik P, Klein PD, Lester R. Bile-Salt Metabolism  
42 in the Newborn. N. Engl. J. Med. 1973;288:431–434.

43 37. Nakai H, Storm TA, Kay MA. Recruitment of Single-Stranded Recombinant  
44 Adeno-Associated Virus Vector Genomes and Intermolecular Recombination Are  
45 Responsible for Stable Transduction of Liver In Vivo. J. Virol. 2000;74:9451–9463.



## Figure legends

### Figure 1. FXR $\alpha$ is a proviral factor for HBV.

Relative mRNA expression levels of FXR $\alpha$ , BSEP, CYP7A1 and NTCP in untransduced and transduced shCtrl and shFXR $\alpha$  dHepaRG cells **A)** at day 0 before infection and **B)** at day 11 post-infection. **C)** Relative secretion levels of HBsAg and rcDNA between day 9 and 11 and relative RNA expression levels of pg/preC and cccDNA quantity at day 11 post-infection in dHepaRG cells. **D)** FXR $\alpha$  protein expression by western-blot in untransduced (treated with DMSO or GW4064 for 9 days) and in transduced shFXR $\alpha$ -dHepaRG cells. For B and C, data are a representative experiment of at least 3 independent experiments. Student's t-test \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### Figure 2. FXR $\alpha$ silencing enhances the effects of FXR $\alpha$ agonist for a subset of HBV markers only.

In transduced shCtrl and shFXR $\alpha$  dHepaRG cells **A)** Relative mRNA expression levels of FXR $\alpha$  and BSEP at day 11 post-infection. **B)** Secreted rcDNA quantity (copies / ml) between day 9 and day 11 post-infection and relative RNA levels of pg/preC at day 11 post-infection. **C)** Secreted HBsAg and HBeAg (signal / cut off) between day 9 and day 11 post-infection. **D)** cccDNA quantity (copies /  $\mu$ g DNA) at day 11 post-infection.

Student's t-test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### Figure 3. FXR $\alpha$ agonist impacts HBV replication at an early and a late step.

**A)** Scheme of the experimental procedure. **B)** cccDNA quantity (copies /  $\mu$ g DNA) at day 11 post-infection, secreted rcDNA quantity (copies / ml), HBsAg and HBeAg (signal/cut off) between day 9 and day 11 post-infection in dHepaRG cells.

Data are a representative experiment of at least 3 independent experiments. One-way ANOVA, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### Figure 4. FXR $\alpha$ and HBx interference on HBV replication.

dHepaRG cells infected with HBVwt ( $10^2$  genome equivalents per cell) and HBV $\Delta$ HBx ( $10^3$  genome equivalents per cell) **A)** cccDNA quantity (copies /  $\mu$ g DNA) at day 11 post-infection and secreted HBeAg (signal / cut off) between day 9 and day 11 post-infection. **B)** Relative pg/preC RNA at day 11 post-infection and secreted rcDNA quantity (copies / ml) and HBsAg (signal / cut off) between day 9 and day 11 post-infection.

Data are a representative experiment of at least 3 independent experiments. Student's t-test \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### Figure 5. HBV infection differences evolution between young and adult C3H/HeN mice.

1  
2  
3 Secreted rcDNA quantity (copies / ml) at day 7, 35 and 91, and HBsAg titers at day  
4 21, 49 and 77 in serum of young 6-week old and adult 12-week old C3H/HeN mice  
5 injected with  $5 \cdot 10^{10}$  AAV2/8-HBV genome copies.  
6 Two-way ANOVA, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .  
7

8 **Figure 6. FXR $\alpha$  agonist differences effect on HBV replication between young**  
9 **and adult C3H/HeN mice.**  
10

11 **A)** secreted rcDNA quantity (copies / ml) at day 7, 14, 21 and 28 and HBsAg titers at  
12 day 7 and 28 in serum of young 6-week old C3H/HeN mice injected with  $2 \cdot 10^{10}$   
13 AAV2/8-HBV genome copies. **B)** secreted rcDNA quantity (copies / ml) and HBsAg  
14 titers at day 7, 14, 21 and 28 and secreted HBeAg at day 7, 14 and 28 in serum of  
15 adult 12-week old adult mice injected with  $2 \cdot 10^{10}$  AAV2/8-HBV genome copies.  
16 Two-way ANOVA, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .  
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

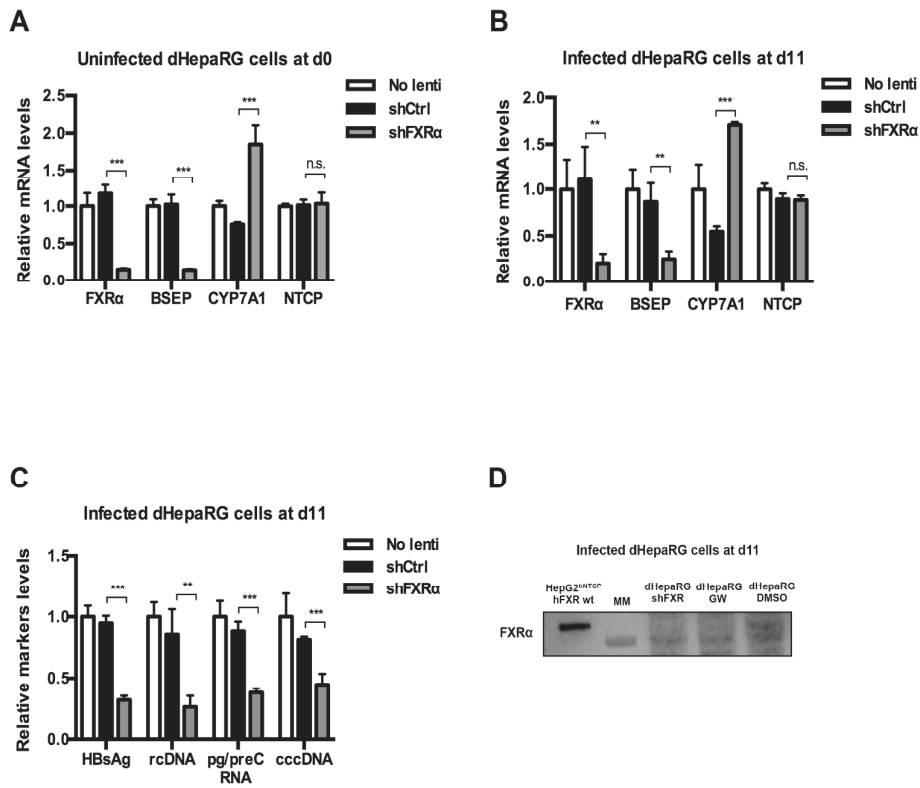


Figure 1. FXRα is a proviral factor for HBV. Relative mRNA expression levels of FXRα, BSEP, CYP7A1 and NTCP in untransduced and transduced shCtrl and shFXRα dHepaRG cells A) at day 0 before infection and B) at day 11 post-infection. C) Relative secretion levels of HBsAg and rcDNA between day 9 and 11 and relative RNA expression levels of pg/preC and cccDNA quantity at day 11 post-infection in dHepaRG cells. D) FXRα protein expression by western-blot in untransduced (treated with DMSO or GW4064 for 9 days) and in transduced shFXRα-dHepaRG cells. For B and C, data are a representative experiment of at least 3 independent experiments. Student's t-test \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

194x158mm (300 x 300 DPI)

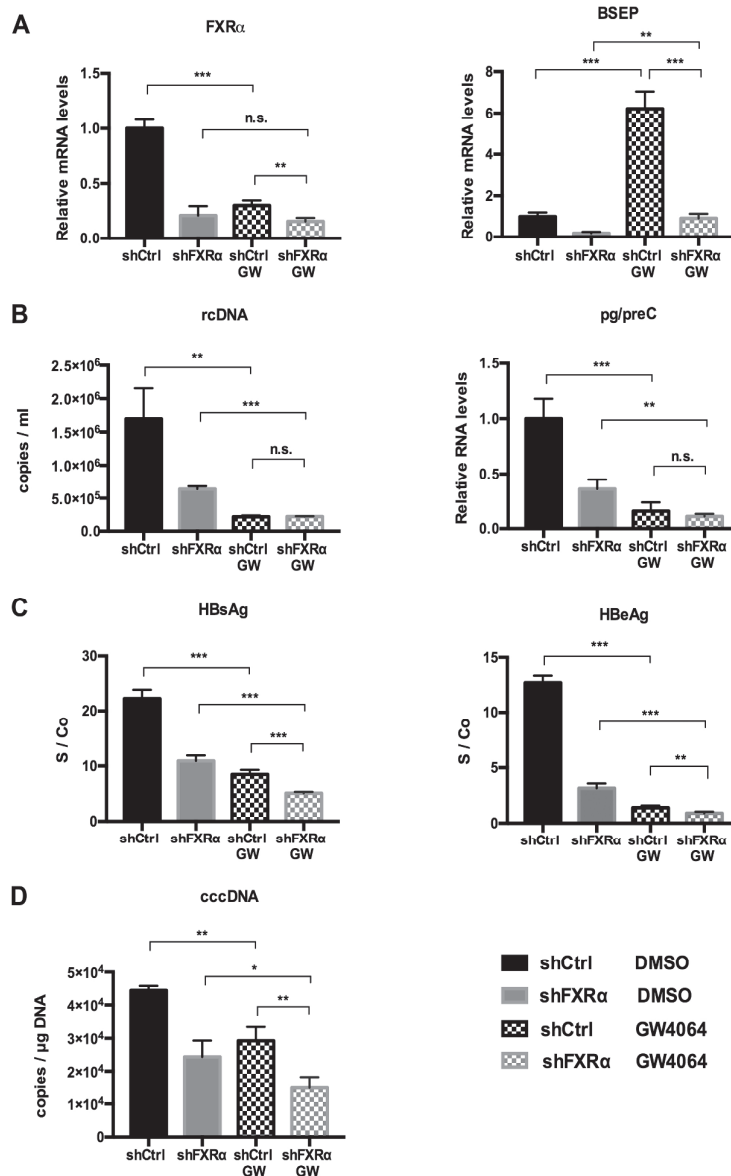


Figure 2. FXR $\alpha$  silencing enhances the effects of FXR $\alpha$  agonist for a subset of HBV markers only. In transduced shCtrl and shFXR $\alpha$  dHepaRG cells A) Relative mRNA expression levels of FXR $\alpha$  and BSEP at day 11 post-infection. B) Secreted rcDNA quantity (copies / ml) between day 9 and day 11 post-infection and relative RNA levels of pg/preC at day 11 post-infection. C) Secreted HBsAg and HBeAg (signal / cut off) between day 9 and day 11 post-infection. D) cccDNA quantity (copies /  $\mu$ g DNA) at day 11 post-infection. Student's t-test. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

183x259mm (300 x 300 DPI)

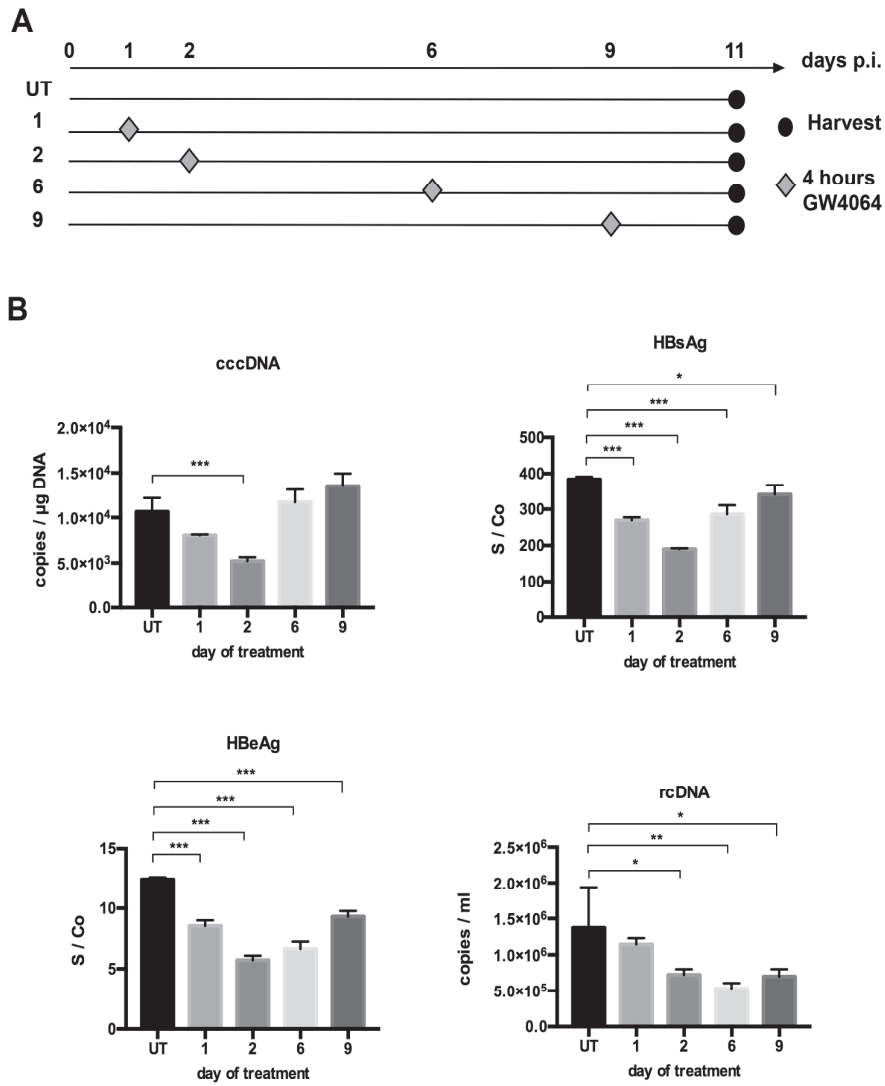


Figure 3. FXR $\alpha$  agonist impacts HBV replication at an early and a late step. A) Scheme of the experimental procedure. B) cccDNA quantity (copies /  $\mu$ g DNA) at day 11 post-infection, secreted rcDNA quantity (copies / ml), HBsAg and HBeAg (signal/cut off) between day 9 and day 11 post-infection in dHepaRG cells. Data are a representative experiment of at least 3 independent experiments. One-way ANOVA, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

198x219mm (300 x 300 DPI)

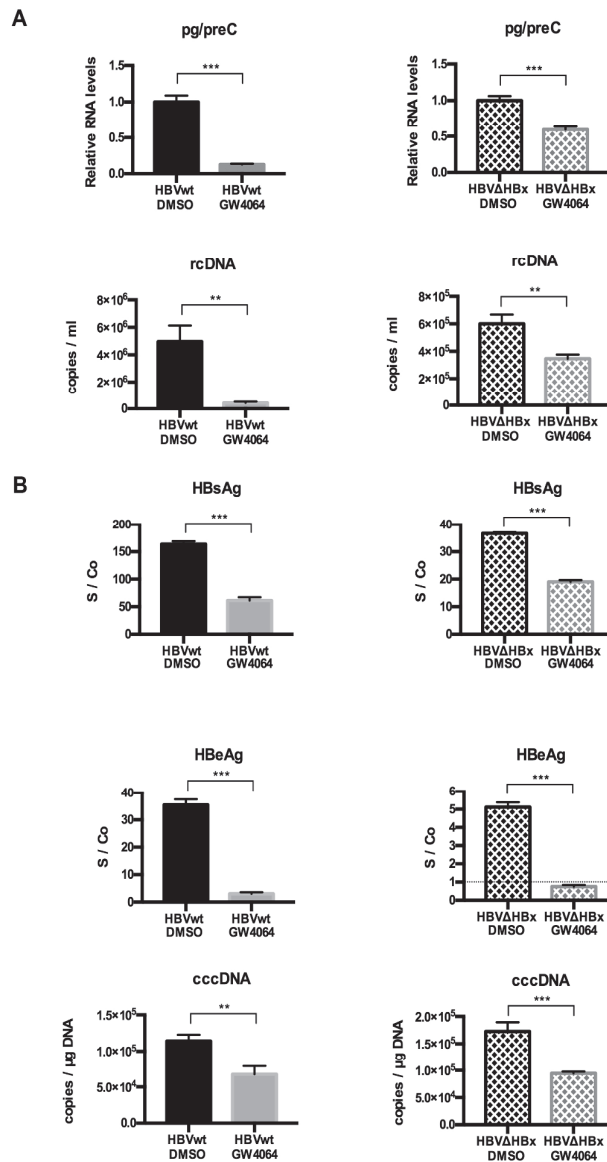


Figure 4. FXRa and HBx interference on HBV replication. dHepaRG cells infected with HBVwt (102 genome equivalents per cell) and HBVΔHBx (103 genome equivalents per cell) A) cccDNA quantity (copies / μg DNA) at day 11 post-infection and secreted HBeAg (signal / cut off) between day 9 and day 11 post-infection. B) Relative pg/preC RNA at day 11 post-infection and secreted rcDNA quantity (copies / ml) and HBsAg (signal / cut off) between day 9 and day 11 post-infection. Data are a representative experiment of at least 3 independent experiments. Student's t-test \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

160x262mm (300 x 300 DPI)

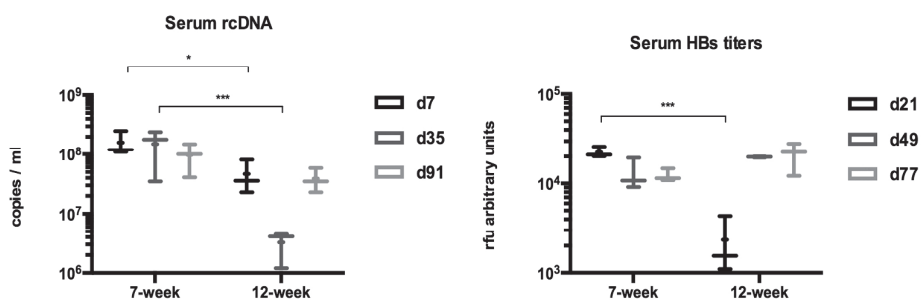


Figure 5. HBV infection differences evolution between young and adult C3H/HeN mice. Secreted rcDNA quantity (copies / ml) at day 7, 35 and 91, and HBsAg titers at day 21, 49 and 77 in serum of young 6-week old and adult 12-week old C3H/HeN mice injected with 5.10<sup>10</sup> AAV2/8-HBV genome copies. Two-way ANOVA, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

199x65mm (300 x 300 DPI)



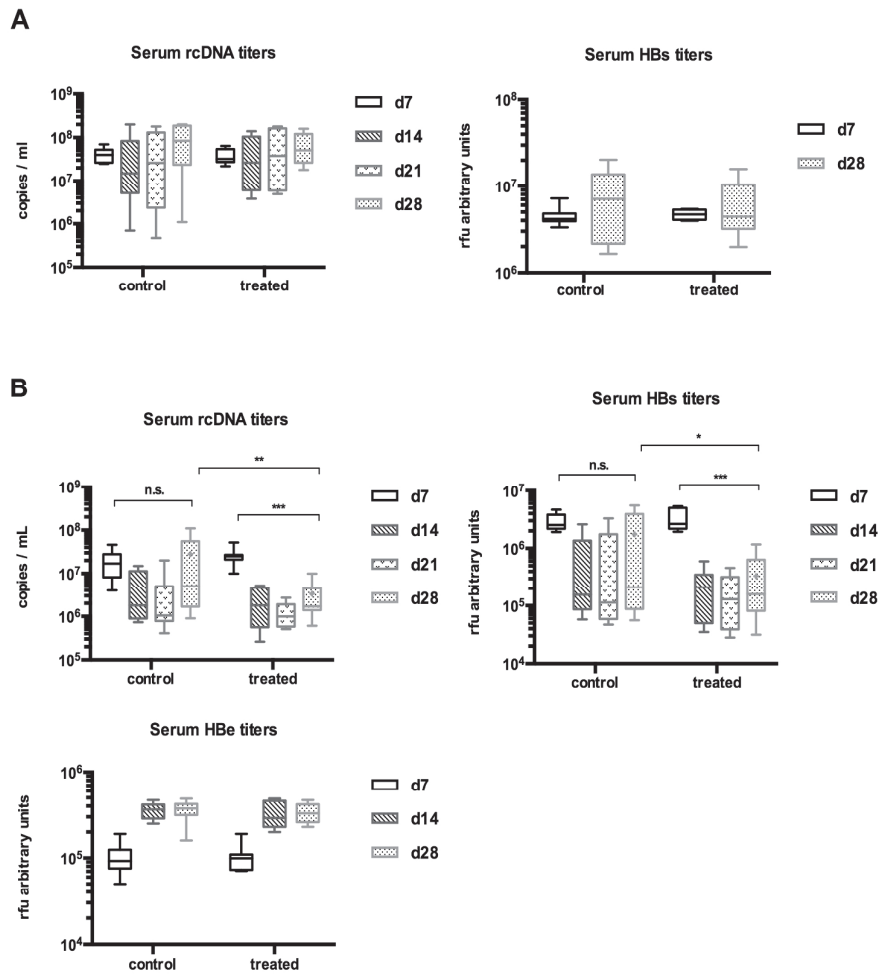


Figure 6. FXR $\alpha$  agonist differences effect on HBV replication between young and adult C3H/HeN mice. A) secreted rcDNA quantity (copies / ml) at day 7, 14, 21 and 28 and HBsAg titers at day 7 and 28 in serum of young 6-week old C3H/HeN mice injected with 2.1010 AAV2/8-HBV genome copies. B) secreted rcDNA quantity (copies / ml) and HBsAg titers at day 7, 14, 21 and 28 and secreted HBeAg at day 7, 14 and 28 in serum of adult 12-week old adult mice injected with 2.1010 AAV2/8-HBV genome copies. Two-way ANOVA, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

206x207mm (300 x 300 DPI)

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

## Supplementary data

### Activation of Farnesoid X Receptor alpha represses its proviral activity in controlling hepatitis B virus cccDNA pool size and transcription

Karim Mouzannar, Floriane Fusil, Benoît Lacombe, Anaïs Ollivier, Camille Ménard, Vincent Lotteau, François-Loïc Cosset, Christophe Ramière, Patrice André

## Contents

### Supplementary methods

Cells

Lentiviral vectors, shRNA and transduction of HepaRG

Quantitative RT-PCR (RT-qPCR)

Western Blot analysis

Albumin measurements

cccDNA quantification

Drugs

### Table 1

### Table 2

### Supplementary references

### Supplementary figures

Supplementary Fig. 1

Supplementary Fig. 2

Supplementary Fig. 3

Supplementary Fig. 4

Supplementary Fig. 5

Supplementary Fig. 6

Supplementary Fig. 7

Supplementary Fig. 8

## Supplementary methods

### Cells

Cells were maintained at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. HEK293T cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with 10% fetal calf serum (FCS), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (P/S). The HepAD38 cell line is derived from HepG2 cells and contains the HBV genome (subtype ayw) under tetracycline control (1). HepAD38 cells were grown in DMEM/F-12 with 10% FCS, P/S, 400 µg/mL geneticin (G418) and 0.3 µg/mL tetracycline (tet). To boost HBV production, confluent cells were cultured without splitting in DMEM/F-12 with P/S, G418 and 2% human serum (H4522 Sigma) to ensure that media was tetracycline-free. HepG2 H1.3ΔHBx cells are derived from HepG2 cells and contain the stable integration of a 1.3-fold HBV genome carrying premature stop codon mutations in both 5' and 3' parts of the HBx open reading frame (2). HepG2 H1.3ΔHBx (kindly provided by Ulrike Protzer) were grown in William's E medium (Thermo Fisher Scientific) with 10% FCS, P/S, 1 mM sodium pyruvate and 1X non-essential amino acids solution (Thermo Fisher Scientific). To induce HBV production in this HBV ΔHBx replicating hepatoma cell line, confluent cells were cultured without splitting in William's E medium with 5% FCS, P/S, 2 mM L-glutamine (L-glut), 7.10<sup>-5</sup> M hydrocortisone hemisuccinate (Sigma), 5 µg/ml insulin-transferrin-selenium (ITS-G Thermo Fisher Scientific), and 2% DMSO (Sigma). HepaRG cells were grown in standard medium: William's E medium supplemented with 10% HyCLone FetalClone II serum (Thermo Fisher Scientific), P/S, L-glut, ITS-G, 20 µg/mL gentamicin (Thermo Fisher Scientific), and 50 µM hydrocortisone hemisuccinate. Cell differentiation was carried out as previously described (3). Briefly, cells were maintained for 2 weeks in standard medium then for at least 2 weeks in standard medium with 1.8% DMSO and 5 ng/mL epidermal growth factor (Roche, Meylan, France). All HepaRG experiments were carried out with cells grown on collagen I-coated plates (BD BioCoat Dutscher).

### *Lentiviral vectors, shRNA and transduction of HepaRG*

HEK293T cells were plated on 10cm culture dishes coated with 0.01% L-polylysine (P4832 Sigma) and co-transfected with 2.5 M CaCl<sub>2</sub> at 50% confluency with a plasmid mix of 8 µg pPAX2, 4 µg pVSVG, and 10 µg pLKO.1-puro-shFXR or 10 µg control pLKO.1-puro-shMafG (Table 1). Cells were washed 6 hours later and medium was replaced with reduced serum medium (Opti-MEM, Thermo Fisher Scientific) for 40 hours. Lentiviral particles were concentrated from the clarified supernatant (0.45 µm filter) by centrifugation for 20 minutes at 4500 rpm in Vivaspin 20 (VS2042 Sartorius).

Undifferentiated HepaRG cells were transduced three days after being plated with concentrated shCtrl or shFXR $\alpha$  lentiviral particles for 24 hours. Then cells were washed and medium was replaced with complete William's E medium for further 24 hours. On the next day, medium was replaced with standard medium containing 3 µg/mL puromycin. At confluency, cells from one well were trypsinized and plated in a 6-well plate. Puromycin selection was maintained till end of experiment.

### Quantitative RT-PCR analysis (RT-qPCR)

Quantitative PCR was carried out with primers designed to cross exon-exon boundaries using the Roche UPL primer design website. RT-qPCR primer sequences are provided in Table 2. cDNA was analysed by quantitative PCR (qPCR) using SYBR Green PCR Master mix (Applied Biosystems) on StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) using a 45 PCR cycles. Relative quantification was determined by normalizing the expression of each gene to housekeeper genes: TBP for experiments in dHepaRG cells and  $\beta$ -actin and Gapdh for experiments in C3H/HeN mice. For absolute quantifications, the viral genome equivalent copies were calculated based on a standard curve generated with known copy numbers of a plasmid containing an HBV genome of greater than unit length (payw1.2).

### Western blot analysis

Western blotting analysis of FXR $\alpha$  expression was carried using monoclonal antibody against FXR $\alpha$  (Clone A9033A, R&D systems Minneapolis, MN, USA). HRP detection with ECL prime reagent (GE Healthcare) was performed according to manufacturer's instructions. HRP signal detection was determined electronically using GE Image Quant LAS 4000 system and parameters set strictly below the saturation point. Lysates of HepG2<sup>hNTCP</sup> transduced with FXR $\alpha$ wt were used as positive control.

### Albumin measurements

Secreted human albumin in dHepaRG supernatant was quantified with Human Albumin ELISA quantification set (E80-129 Bethyl laboratories) according to manufacturer's protocol.

### cccDNA quantification

Total cellular DNA from dHepaRG cells was extracted using the MasterPure DNA purification kit (Epicentre, Madison, WI, USA). 6  $\mu$ g of DNA were treated with 1  $\mu$ L of T5 exonuclease (New England Biolabs, Ipswich, USA) in a final volume of 15  $\mu$ L for 1 hour at 37°C followed by inactivation at 99°C for 5 minutes.

A two-step protocol was used for cccDNA quantification, inspired by Jun-Bin *et al.* (4) with several important modifications.

First, a single-strand elongation step was performed using the Platinum Taq DNA polymerase kit (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) and the chimeric primer chim-cccDNA-3 (5'-ACCCAATGTGCCTGGATGCGATGAACAAGAGATGATTAGG-3'). This primer is composed of a tag sequence at the 5'-end and a complementary sequence to HBV DNA plus (+) strand from nucleotides 1836 to 1855 (Genbank accession number U95551) at the 3'-end. 5  $\mu$ L of treated DNA were mixed with 10 X PCR buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2  $\mu$ M of chim-cccDNA-3 primer (5'-ACCCAATGTGCCTGGATGCGATGAACAAGAGATGATTAGG-3'), 0.2 mM of dNTPs mix and 1 U of Taq DNA polymerase in a final volume of 25  $\mu$ L. The thermal conditions were 94°C for 2 minutes followed by 20 cycles at 94°C for 20 s, 50°C for 20 s and 72°C for 45 s.

1  
2  
3 Elongation products were then diluted 10 times and used for quantification with the  
4 Fast Start Taqman Probe Master (Roche Diagnostics, Meylan, France). 5  $\mu$ L of  
5 diluted elongation products were mixed with 0.5  $\mu$ M of GST-Tag primers (5'-  
6 ACCCAATGTGCCTGGATGCG-3') and cccDNA-fluo-P2bis (5'-  
7 GCACCTCTCTTTACGCGGAC-3' 1) and 0.25  $\mu$ M of Taq-cccDNA probe (5'-FAM-  
8 CCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCG-BHQ1-3' 1) in a final volume of 25  $\mu$ L. The  
9 thermal conditions were 95°C for 10 minutes followed by 45 cycles at 95°C for 15 s  
10 and 60°C for 60 s.

11 A series of experiments were performed to evaluate sensitivity, specificity and  
12 linearity of the protocol (Fig. S8).  
13

#### 14 *Drugs*

15  
16 FXR $\alpha$  agonist GW4064 was purchased from Sigma-Aldrich (for *in vitro* experiments)  
17 and from MedChemExpress (for *in vivo* experiments). Carboxymethylcellulose and  
18 Tween 80 were purchased from Sigma.  
19  
20

21  
22 **Table 1. shRNAs sequences**

Name	Mature antisense sequence	Clone ID	Reference
Human shFXR $\alpha$	CCGGCCTGACTGAATTACG GACATCTCGAGATGTCCGTA ATTCAGTCAGGCTTTTT	NM_005123.1- 1660s1c1	TRCN00000 21605 (Sigma)
shCtrl	CCGGTAGTAAAGTCCAAGAC GGATGCTCGAGCATCCGTCT TGGACTTTACTATTTTTTG	NM_002359.2- 672s21c1	TRCN00004 31284 (Sigma)

**Table 2. RT-qPCR and qPCR Primer sequences**

<b>Target</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
Human NR1H4 (FXR)	5'- AGAGATGGGAATGTTGG CTGA-3'	5'- GCATGCTGCTTCACATTTTT T-3'
Human NTCP	5'- GGCTTTCTGCTGGGTTAT GT-3'	5'- CATGCTGACAGTGCCTCTG- 3'
Human APOA1	5'- CCCAGTTGTCAAGGAGCT TT-3'	5'- TGGATGTGCTCAAAGACAG C-3'
Human CYP7A1	5'- GCTTATTCTTGAATTAG GAGAAGG-3'	5'- TTGGCACCAAATTGCAGAG- 3'
Human BSEP	5'- CTTCATCATGGACCTGCC ACAGCAAT-3'	5'- GGATTCGGATGAGGGCTC TG-3'
Human TBP	5'- CCACGAACCACGGCACT GATTT-3'	5'- CAGTCTGGACTGTTCTTCAC TCTT-3'
Mouse Nr1h4	5'- CTTGATGTGCTACAAAAG CTGTG-3'	5'- ACTCTCCAAGACATCAGCAT CTC-3'
Mouse Cyp7a1	5'- AGCAACTAAACAACCTGC CAGTACTA-3'	5'- GTCCGGATATTCAAGGATG CA-3'
Mouse Bsep	5'- AAGCTACATCTGCCTTAG ACACAGAA-3'	5'- CAATACAGGTCCGACCCTC TCT-3'
Mouse $\beta$ -actin	5'- TATTGGCAACGAGCGGTT CC-3'	5'- GGCATAGAGGTCTTTACGG ATGTC-3'
Mouse Gapdh	5'- TGCACCACCAACTGCTTA G-3'	5'- GGATGCAGGGATGATGTTT- 3'
HBV pg/preC	5'- CTTTTTCACCTCTGCCTA ATCATC-3'	5'- CACAGCTTGGAGGCTTGAA CAGTGG-3'
HBV rcDNA	5'- GGGGAGGAGATTAGGTT AAAGGTC-3'	5'- CACAGCTTGGAGGCTTGAA CAGTGG-3'

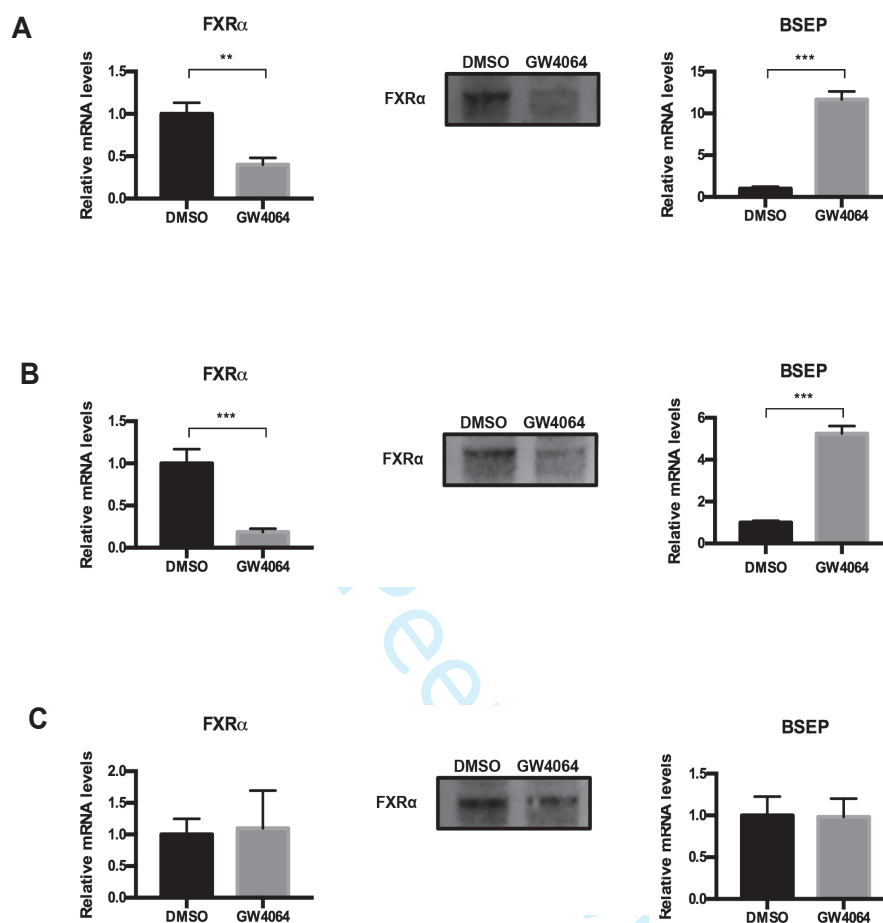


**Supplementary references**

1. Ladner SK, Otto MJ, Barker CS, Zaifert K, Wang GH, Guo JT, et al. Inducible expression of human hepatitis B virus (HBV) in stably transfected hepatoblastoma cells: a novel system for screening potential inhibitors of HBV replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997;41:1715–1720.
2. Lucifora J, Xia Y, Reisinger F, Zhang K, Stadler D, Cheng X, et al. Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science.* 2014;343:1221–1228.
3. Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, et al. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002;99:15655–15660.
4. Jun-Bin S, Zhi C, Wei-Qin N, Jun F. A quantitative method to detect HBV cccDNA by chimeric primer and real-time polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods.* 2003;112:45–52.

## Supplementary figures

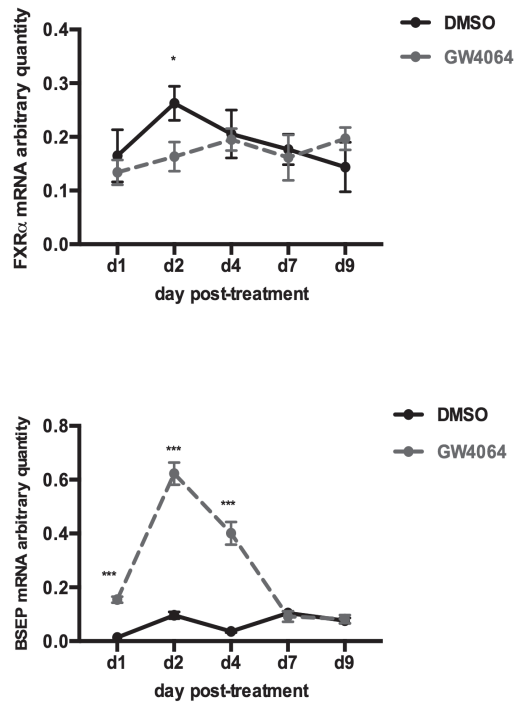
## Supplementary figure 1



**Figure S1. Impact of GW4064 on FXR $\alpha$  and BSEP expression in dHepaRG cells.**

Relative mRNA expression levels of FXR $\alpha$  and BSEP quantified by RT-qPCR and FXR $\alpha$  protein expression analyzed by western blot in dHepaRG cells after a GW4064 treatment of **A)** 2 days, **B)** 9 days and **C)** 2 days before removing the drug for 7 other days. Data are a representative experiment of at least 3 independent experiments. Student's t-test \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

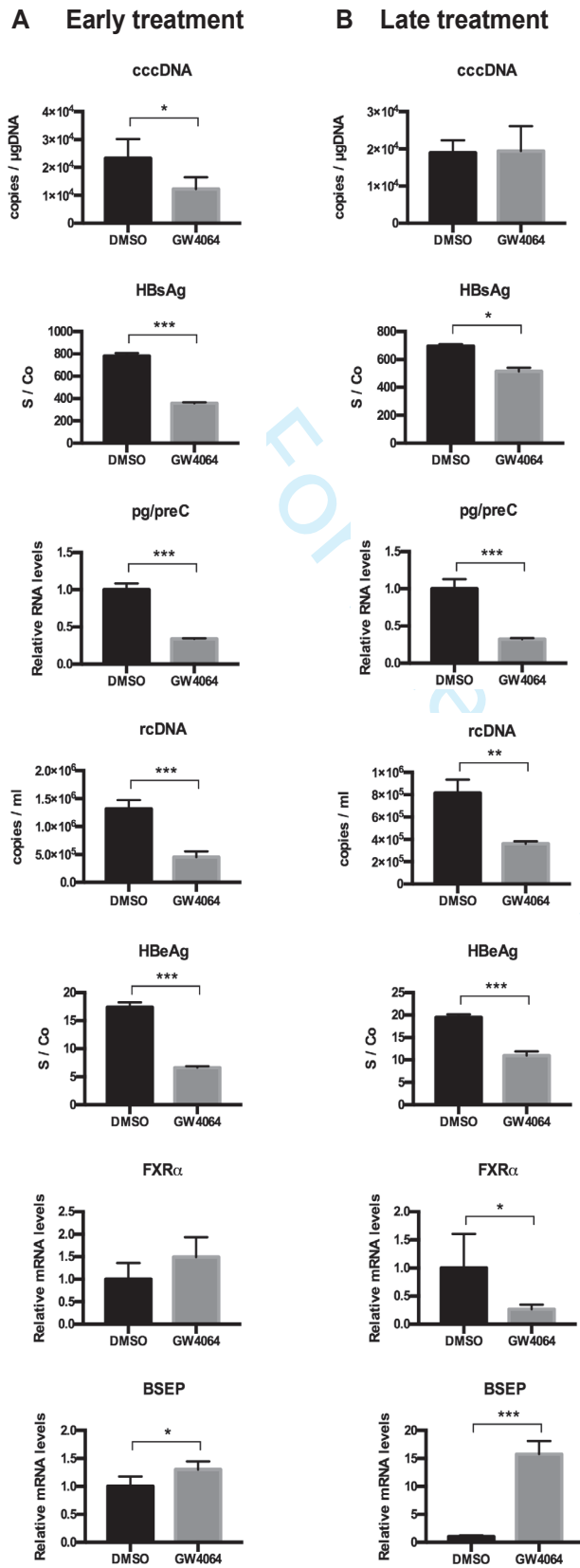
## Supplementary figure 2



**Figure S2. Temporal evolution of FXR $\alpha$  and BSEP mRNA expression in dHepaRG following a 4-hour treatment with FXR $\alpha$  agonist GW4064.**

mRNA expression of FXR $\alpha$  and BSEP were quantified in dHepaRG cells at day 1, 2, 4, 7 or 9 following a 4-hour treatment with GW4064 or DMSO at day 0. TBP quantification was used for normalization. Two-way ANOVA, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

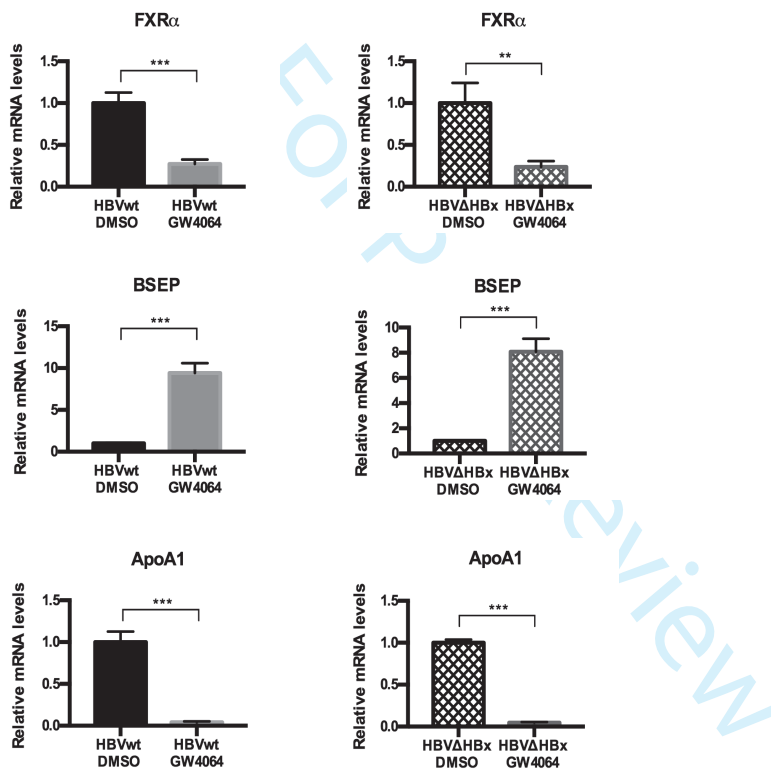
## Supplementary figure 3



**Figure S3. Effects of an early and a late treatment with FXR $\alpha$  agonist GW4064 on HBV markers of infection.**

cccDNA quantity (copies /  $\mu$ g DNA), secreted rcDNA quantity (copies / mL), secreted HBsAg and HBeAg (signal/cut off) and relative RNA levels of pg/preC, FXR $\alpha$  and BSEP were analyzed at day 11 post-infection in dHepaRG following a 4-day treatment of GW4064 or DMSO **A)** from day 1 to day 5 post-infection (Early treatment) or **B)** from day 7 to day 11 post-infection (Late treatment). Data are a representative experiment of at least 3 independent experiments. Student's t-test \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

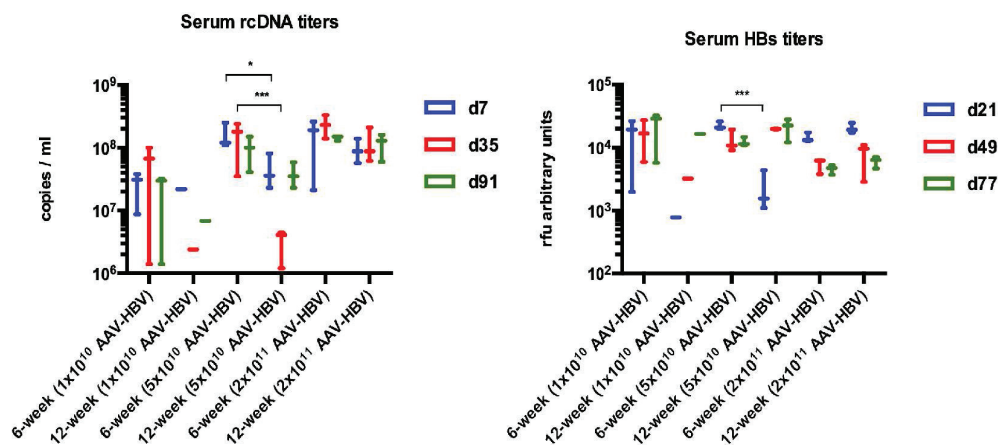
**Supplementary figure 4**



**Figure S4. HBx does not modify expression of FXR $\alpha$  and FXR $\alpha$  target genes.**

Relative mRNA expression levels of FXR $\alpha$ , BSEP and APOA1 at day 11 post-infection in dHepaRG cells infected with HBVwt ( $10^2$  GE/cell) and HBV $\Delta$ HBx ( $10^3$  GE/cell). Data are a representative experiment of at least 3 independent experiments. Student's t-test \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

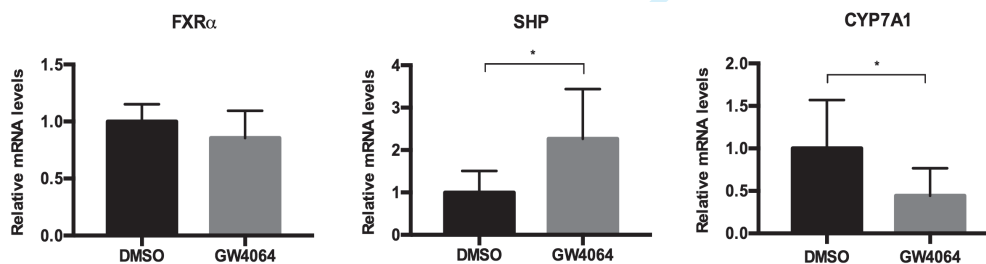
## Supplementary figure 5



**Figure S5. The evolution of HBV infection differs between young and adult C3H/HeN mice.**

Secreted rcDNA quantity (copies / mL) at day 7, 35 and 91 and secreted HBsAg (rfu arbitrary units) at day 21, 49 and 77 in young 6-week old and adult 12-week old C3H/HeN mice serum transduced with  $1.10^{10}$ ,  $5.10^{10}$  and  $2.10^{11}$  AAV2/8-HBV genome copies. Two-way ANOVA, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

## Supplementary figure 6

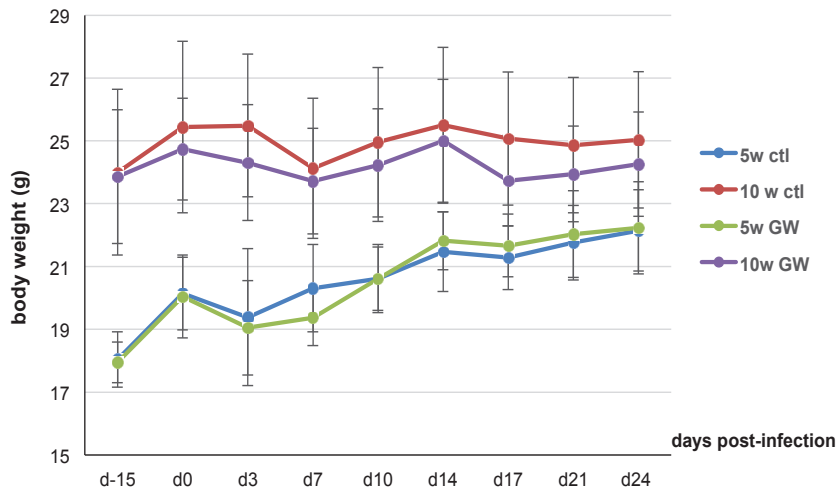


**Figure S6. Impact of FXR $\alpha$  agonist GW4064 on FXR $\alpha$  genes expression profile in adult C3H/HeN mice.**

Relative mRNA expression of FXR $\alpha$ , SHP and CYP7A1 in non-infected liver cells of adult C3H/HeN mice 6 hours after last gavage of a 2-day 2-shot of 50 mg/kg/day GW4064 or DMSO. GAPDH and  $\beta$ -actin quantification were used for normalization. Student's t-test \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



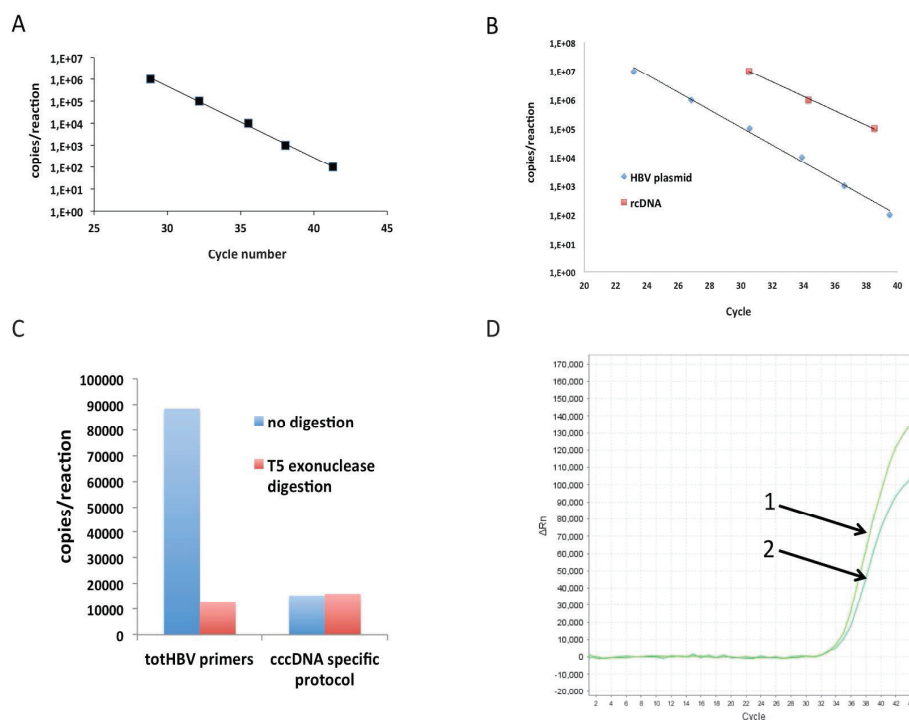
## Supplementary figure 7



**Figure S7. Evolution of body weight of HBV infected mice receiving GW4064 or vehicle.**

Four groups of mice were weighed at indicated time points: 8 mock-treated 5-week mice, 8 GW4064-treated 5-week mice, 8 mock-treated 10-week mice and 11 GW4064-treated 10-week mice. Transduction of rAAV2/8-HBV was performed at day 0. From day 0 till end of experiment, mice were treated 6 days per week with GW4064 (50 mg/kg/day) or vehicle by oral gavage.

## Supplementary figure 8



**Figure S8. Evaluation of the cccDNA quantification protocol.**

**A)** Standard curve derived from serial dilutions of a plasmid containing a complete HBV genome (Genbank accession number U95551) using the cccDNA specific protocol. **B)** Standard curves derived from serial dilutions of either a plasmid containing a complete HBV genome (blue dots) or rcDNA (red dots), using the cccDNA specific protocol. To prepare rcDNA, an aliquot of HBV stock prepared from HepAD38 supernatant was purified and quantified. **C)** Total DNA was extracted from HBV infected dHepaRG cells and treated or not with T5 exonuclease. HBV DNA was quantified either with primers used for rcDNA quantification (TotHBV DNA) or cccDNA specific protocol. **D)** Total DNA was extracted from HBV infected dHepaRG cells and treated with T5 exonuclease. HBV DNA was quantified with the cccDNA specific protocol with (1) or without (2) addition of  $1.10^5$  copies of rcDNA in the sample after T5 exonuclease digestion. Amplification plots are presented.

# DISCUSSION

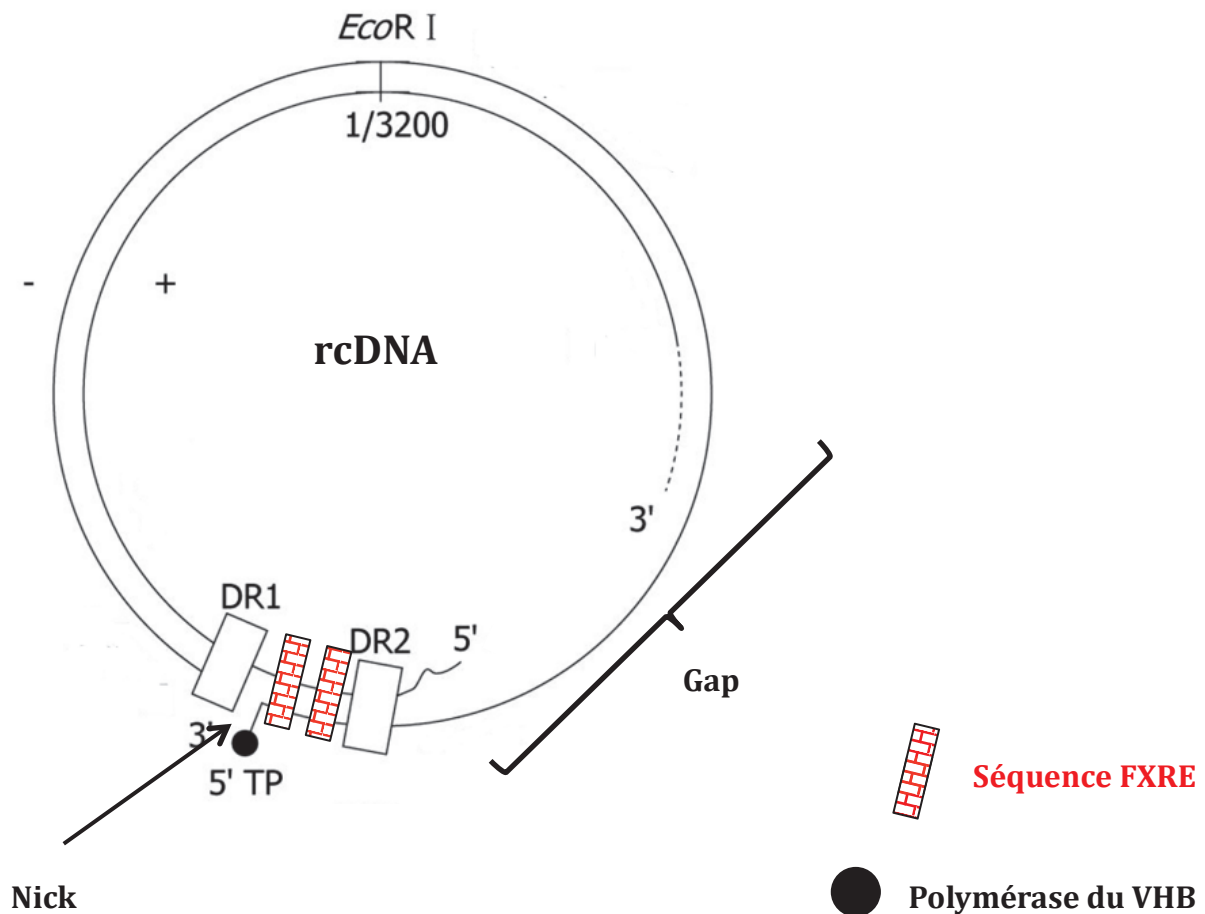
Notre équipe a identifié en 2008 un premier lien entre l'infection par le VHB et le métabolisme des AB en montrant que FXR $\alpha$ , le récepteur nucléaire des AB, se lie directement à ses deux éléments de réponse (FXRE) présents dans la région Enh2Cp du génome du VHB qui est une zone critique pour son établissement sous forme de cccDNA et pour son expression <sup>250</sup>.

La première étude à laquelle j'ai participé et que nous avons publiée dans *The FASEB Journal* <sup>285</sup> a montré l'interdépendance entre l'infection par le VHB et FXR $\alpha$  dans deux modèles cellulaires pertinents qui sont les dHepaRG et les HPH. Nous avons montré que l'infection par le VHB modifie l'expression de FXR $\alpha$  et des gènes qu'il régule avec des effets plus prononcés dans les HPH que dans les dHepaRG (probablement dû à la plus grande proportion de cellules infectées dans les HPH que dans les dHepaRG). Dans ces deux modèles nous obtenons une augmentation significative de l'expression des ARNm de FXR $\alpha$  et de deux gènes négativement régulés par ce dernier (*CYP7A1* et *APOA1*) après 11 jours d'infection. Une étude *ex vivo* sur des biopsies de foies de patients infectés a aussi rapporté des modifications similaires du profil des gènes dépendants de FXR $\alpha$  causées par l'infection par le VHB <sup>256</sup>. L'infection par le VHB augmente donc l'expression de FXR $\alpha$  mais semble le maintenir dans un état de faible niveau d'activité permettant ainsi la transcription de gènes négativement régulés, directement ou indirectement, par FXR $\alpha$ .

Dans cette même étude nous montrons également, dans ces deux modèles dHepaRG et HPH, que deux agonistes bien caractérisés de FXR $\alpha$  et ayant des structures différentes (GW4064 et 6-ECDCA) diminuent la taille du pool de cccDNA, la transcription de tous les ARN viraux ainsi que la synthèse des protéines virales. À l'inverse, un acide biliaire n'ayant pas d'action sur FXR $\alpha$  (UDCA) ou un antagoniste de FXR $\alpha$  (Tak) n'ont pas d'effets sur la réplication virale. La possibilité que l'effet antiviral des agonistes de FXR $\alpha$  soient dû à une compétition avec les virions de l'hépatite B pour fixation au récepteur d'entrée NTCP a été écartée puisqu'un traitement à la Cyclosporine A, un inhibiteur d'entrée du VHB <sup>286</sup>, ajouté à une étape post-infection, n'a pas d'effet sur le cours de l'infection alors qu'avec l'ajout des agonistes dans les mêmes conditions, il y a inhibition de la production de tous les éléments viraux.

Dans ces deux modèles *in vitro*, les agonistes de FXR $\alpha$  diminuent l'expression de FXR $\alpha$  au niveau transcriptionnel et traductionnel. Ce rétrocontrôle négatif empêche et reverse les effets du VHB sur les gènes cibles de FXR $\alpha$ . Cette observation suggérait que l'effet des agonistes de FXR $\alpha$  sur le VHB pourrait dépendre en plus grande partie de la disponibilité de FXR $\alpha$  pour sa fixation sur le cccDNA que de la modulation de l'expression des gènes en présence ou en absence d'agonistes de FXR $\alpha$ . Nous avons donc cherché à comprendre si l'effet antiviral des agonistes de FXR $\alpha$  dépendait de la diminution de son expression ou d'une augmentation de son activité. Pour cela, dans la deuxième étude de ma thèse que nous avons soumise à *Hepatology*, nous avons d'abord effectué des expériences d'extinction de FXR $\alpha$  dans les dHepaRG et nous avons montré que cette extinction était suffisante pour inhiber la synthèse de l'ensemble des marqueurs viraux y compris en l'absence d'agonistes de FXR $\alpha$ . Cependant, le traitement par un agoniste de FXR $\alpha$  dans des cellules où FXR $\alpha$  était éteint a montré que la production des marqueurs viraux était affectée à la fois par la réduction d'expression de FXR $\alpha$  et par les modifications de son état induit par son agoniste avec des effets additifs.

Ces premiers résultats montrent que FXR $\alpha$  joue un rôle proviral dans le cycle d'infection par le VHB et que cet effet proviral peut être aboli par les agonistes de FXR $\alpha$ . Nous avons par la suite cherché à comprendre si FXR $\alpha$  était indispensable à une seule étape bien précise ou à plusieurs étapes du cycle viral. Nos expériences de traitements précoces ou tardifs ont montré que l'agoniste de FXR $\alpha$  réduit la taille du pool de cccDNA à des étapes précoces du cycle lorsque que le cccDNA se forme dans les dHepaRG<sup>287</sup>, mais pas à un stade tardif. Cet effet inhibiteur sur le cccDNA est indépendant de HBx. De manière intéressante, une étude a récemment montré le recrutement rapide de FXR $\alpha$  de manière dépendante de son domaine DBD sur des lésions d'ADN induites par la microirradiation au laser UV sur des cellules *in vitro*<sup>230</sup>. L'hypothèse d'une fonction non suspectée de FXR $\alpha$  dans la réparation de l'ADN du VHB pourrait être plausible. En faveur de cette hypothèse, il faut noter que les deux séquences FXRE identifiées sur la région Enhancer 2 - Promoteur de core du génome du VHB sont localisées dans une petite région (<300 pb) entre les deux séquences répétées DR1 et DR2 où la majorité des étapes de réparation du rcDNA ont lieu. **(Figure 27).**



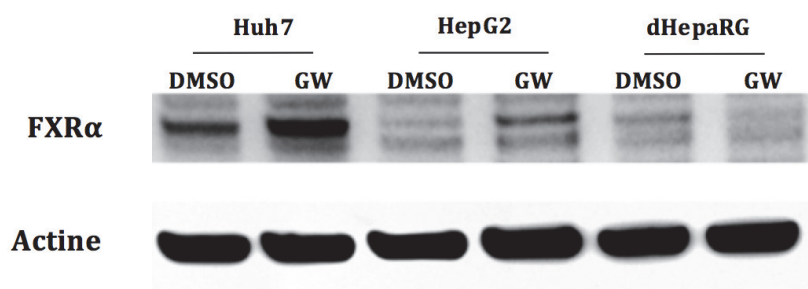
**Figure 27 : Localisation des deux séquences FXRE présents sur le rcDNA du VHB.** Les deux séquences FXRE sont présents dans la région Enhancer 2 - Promoteur de Core entre les séquences répétées directes DR1 et DR2 de part et d'autre du brin d'ADN positif (+) incomplet créant un trou (Gap) et du brin d'ADN négatif (-) débordant (Nick) lié de façon covalente à la polymérase virale (TP).

Un argument supplémentaire est l'existence d'une interaction entre FXR $\alpha$  et la protéine PARP1. Les poly(ADP-ribose) polymérase (PARPs) sont une famille d'enzymes qui modulent divers processus biologiques à travers le transfert de façon covalente de l'ADP-ribose provenant de la forme oxydée du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD<sup>+</sup>) sur des substrats protéiques. PARP1 se fixe sur les sites de lésions à l'ADN, subit des automodifications et PARyle des facteurs comme l'histone H1 et XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein 1 ; qui agit comme protéine d'échafaudage en s'ancrant sur les lésions d'ADN). Cela permet le recrutement rapide des protéines de liaisons à PARP sur le site de lésions à l'ADN pour assurer les réparations <sup>288</sup>. Une étude a montré que PARP1 se fixe à FXR $\alpha$  et le poly(ADP-ribosyle) <sup>289</sup>. La poly-(ADP-ribosylation) décroche FXR $\alpha$  de ses éléments de réponses FXRE présents sur les régions promotrices des gènes cibles et régulés par FXR $\alpha$  et empêche leur transcription. De plus, le traitement avec un agoniste de FXR $\alpha$  atténue la poly(ADP-ribosylation) de FXR $\alpha$  et favorise l'expression des gènes dépendants de FXR $\alpha$ . Le recrutement et l'activation de facteurs nécessaires à la réparation du cccDNA pourraient être ainsi régulés par cette interaction entre FXR $\alpha$  et PARP1. Il est à noter que la région C-terminale de HBx se fixe au domaine catalytique de PARP1 et en réduit son activité enzymatique <sup>290</sup>. HBx empêche aussi la fixation de PARP1 à SIRT6, qui est requis pour la réparation de l'ADN. Cependant, nos résultats montrent que HBx ne semble pas nécessaire à l'effet proviral de FXR $\alpha$  sur la taille du pool de cccDNA. Le rôle éventuel d'un complexe putatif PARP1-HBx-FXR $\alpha$  dans l'infection par le VHB reste à explorer.

En plus du rôle de FXR $\alpha$  sur la taille du pool de cccDNA, nos résultats montrent que les agonistes de FXR $\alpha$  inhibent la synthèse des ARNpg/preC et la sécrétion du rcDNA tout au long du cycle viral y compris à une étape tardive au moment où la taille du pool de cccDNA est bien établie et que sa transcription est active.

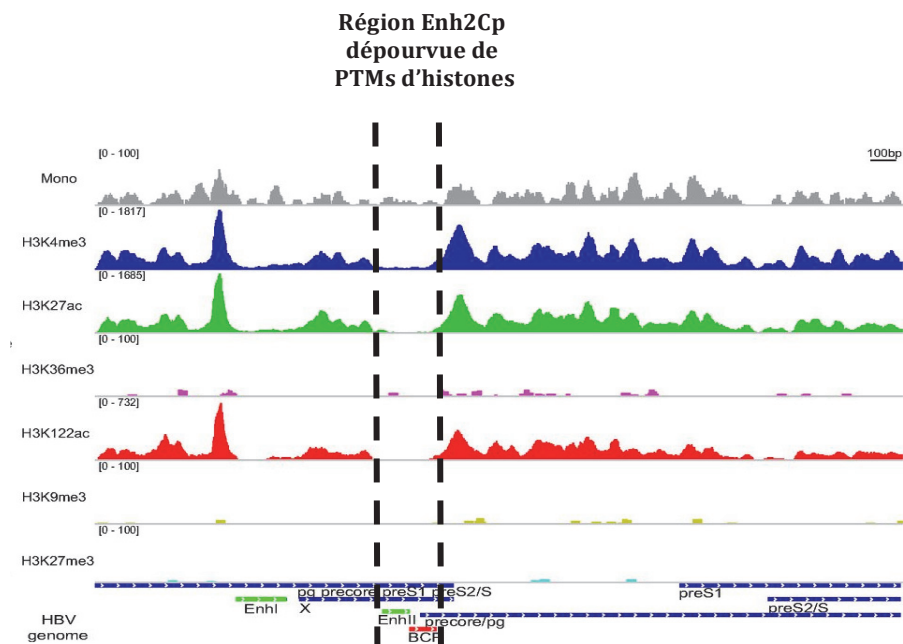
Comme pour le pool de cccDNA, le niveau d'expression de FXR $\alpha$  semble jouer un rôle crucial pour l'activité transcriptionnelle du cccDNA. Nous avons montré que dans les dHepaRG et les HPH, l'activation de FXR $\alpha$  par ses agonistes réduit jusqu'à 80% l'expression de son ARNm et son niveau protéique. Cet effet semble physiologique car il avait été précédemment observé dans des modèles animaux. Il pourrait résulter d'un rétrocontrôle négatif indirect médié par SHP, gène induit par FXR $\alpha$ , qui réprime l'expression de HNF1 $\alpha$ , un facteur de transcription nécessaire pour l'expression de FXR $\alpha$  <sup>291</sup>. Il est à noter qu'en fonction des lignées cellulaires, le traitement par les agonistes de FXR $\alpha$  a des effets différents sur son expression en ARNm et sur son niveau protéique. Ainsi, la régulation de l'expression de FXR $\alpha$  et de son activité semble être altérée dans les lignées Huh7, Huh7<sup>hNTCP</sup>, HepG2 et HepG2<sup>hNTCP</sup> qui sont issues d'hépatocarcinome humain et qui sont aussi des modèles d'étude *in vitro* du VHB couramment utilisés. Dans ces lignées, le traitement par des agonistes de FXR $\alpha$  augmente l'expression protéique de FXR $\alpha$ , contrairement aux observations dans les dHepaRG et les HPH (**Figure 28**). Ces différences ont des retombées sur la réplication du VHB puisque, dans nos données non publiées, le traitement au GW4064 n'a pas d'impact sur la réplication virale dans les Huh7<sup>hNTCP</sup> et HepG2<sup>hNTCP</sup> infectées par le virus entier contrairement à l'effet antiviral observé dans les dHepaRG et les HPH infectées. Pour cette raison nous avons privilégié les modèles dHepaRG et HPH aux modèles Huh7 et HepG2 pour l'étude *in vitro* du rôle de FXR $\alpha$  dans le cycle viral du VHB.





**Figure 28 : Différente réponse aux agonistes de FXR $\alpha$  dans les lignées hépatocytaires.** Analyse de l'expression protéique de FXR $\alpha$  et de l'actine par western blot dans des cellules Huh7, HepG2 et dHepaRG traitées au DMSO ou au GW4064 pendant 48 heures.

L'inhibition de la transcription induite par les ligands de FXR $\alpha$  est quant à elle dépendante de HBx pour certains marqueurs (rcDNA et en partie AgHBs) et semble-t-il moins pour d'autres (AgHBe). Ces résultats suggèrent que le rôle bien établi de HBx dans l'induction et le maintien de la transcription du cccDNA pourrait dépendre en partie de la présence de FXR $\alpha$ . De manière intéressante, Tropberger *et al.* ont montré que la région Enh2Cp, où de nombreux facteurs nucléaires se fixent, est largement dépourvu de nucléosomes<sup>88</sup> (**Figure 11**). Ceci pourrait éventuellement créer un accès libre à FXR $\alpha$  pour se fixer aux FXRE et recruter à travers son interaction avec HBx un complexe macromoléculaire régulant la transcription du cccDNA alors que son agoniste pourrait déstabiliser ces interactions.



**Figure 11 : Distribution des nucléosomes et des modifications post-traductionnelles d'histones sur le génome du VHB.** La région Enh2Cp est dépourvue d'histones gardant cette région accessible à des facteurs de transcription. D'après (<sup>88</sup>).

Récemment, Niu *et al.* ont montré que HBx se fixe sur FXR $\alpha$  avec des conséquences fonctionnelles sur l'expression des gènes cellulaires <sup>262</sup>. Notre équipe, dans des résultats non publiés a également retrouvé par co-IP réciproque cette interaction directe entre FXR $\alpha$  et HBx. L'interaction FXR $\alpha$ -HBx implique le domaine AF1 en N-terminal de FXR $\alpha$  gardant accessible les domaines DBD et LBD de FXR $\alpha$  et la deuxième hélice  $\alpha$  de HBx. Il a été montré récemment qu'un rôle essentiel de HBx est de séquestrer le complexe CUL4-DDB1 (CRL4) pour cibler et dégrader le complexe Smc5/6 <sup>118</sup>. Le blocage de ce processus inhibe l'expression de gènes rapporteurs extrachromosomique et la transcription du VHB. De manière intéressante, l'ubiquitination de Smc5/6 par CRL4 nécessite plusieurs étapes moléculaires. Notamment, une liaison covalente entre DDB1 et HBx a dû être introduite pour forcer DDB1 à choisir HBx parmi tous les interactants possible de DDB1. Compte tenu de l'interaction entre FXR $\alpha$  et HBx, on pourrait rechercher des interactions entre FXR $\alpha$  et les protéines du complexe Smc5/6-CRL4 pour déterminer si FXR $\alpha$  peut favoriser la reconnaissance de ce complexe par HBx et donc sa dégradation.

Un autre complexe d'interactions protéiques entre FXR $\alpha$ , HBx et l'histone désacétylase SIRT1, pourrait également participer à la régulation de la transcription du cccDNA par FXR $\alpha$ . En effet, FXR $\alpha$  est une cible de SIRT1 (désacétylation de la lysine 217 de FXR $\alpha$ ) <sup>257</sup> et un réseau de protéines cellulaires incluant FXR $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ , SIRT1 modulent de manière interdépendante l'activité de la région Enh2Cp du VHB <sup>252</sup>. La présence de SIRT1 sur le cccDNA est associée à une faible répllication du VHB <sup>258</sup> et HBx se fixe directement sur SIRT1 et altère sa fonction <sup>261</sup>. Ainsi en fonction de son activation par le ligand, FXR $\alpha$  pourrait réguler la balance de fixation sur le cccDNA de HBx et SIRT1, qui est un paramètre clef pour le contrôle de la transcription du VHB <sup>258</sup>.

Nos résultats montrent une régulation distincte de la sécrétion du rcDNA et de l'AgHBe en réponse au traitement à l'agoniste de FXR $\alpha$  et suggèrent que l'ARNpg et l'ARNpreC soient régulés de manières différentes par FXR $\alpha$ . Malgré le fait que la transcription de l'ARNpg et l'ARNpreC soient contrôlés par la même région Enh2Cp et que leurs sites de début de transcription soient très proches, une étude a montré qu'il existe une régulation différente de ces deux ARNs par d'autres récepteurs nucléaires. Par exemple, il a été rapporté que les récepteurs nucléaires HNF4 $\alpha$  et TR2 réprimaient sélectivement la synthèse de l'ARNpreC sans effets sur l'ARNpg et que l'hétérodimère PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$  activait sélectivement l'ARNpg sans effets sur l'ARNpreC <sup>249</sup>.

En résumé, nos résultats montrent que FXR $\alpha$  a au moins deux activités provirales pour le VHB. D'abord, à une étape précoce du cycle, FXR $\alpha$  pourrait être impliqué dans la formation et/ou la maintenance du cccDNA (par des mécanismes restant à identifier). Cette étape est indépendante de HBx mais a des conséquences sur tous les marqueurs viraux du VHB. Ensuite, à une étape plus tardive du cycle, en plus du contrôle de la taille du pool du cccDNA, FXR $\alpha$  module la transcription du cccDNA. Cette étude montre ainsi qu'en fonction de l'étape du cycle viral, les marqueurs du VHB sont différemment impactés par la réduction de l'expression de FXR $\alpha$ , par les modifications de son état induits par les agonistes et par l'interférence de HBx avec FXR $\alpha$ .

Dans une dernière étape de ce travail, nous avons voulu déterminer si l'effet antiviral des agonistes de FXR $\alpha$  obtenu *in vitro* pouvait se retrouver dans un modèle physiologique *in vivo*. Nous avons testé dans un premier temps l'impact des agonistes de FXR $\alpha$  dans un modèle de souris à foie humanisé. Nous avons observé une absence d'effets sur les gènes cibles de FXR $\alpha$  et sur l'évolution de l'infection du VHB (données

non montrées). Une autre étude a aussi montré que le traitement par un agoniste de FXR $\alpha$  dans ce modèle de souris à foie humanisées infectées par le VHB ne modifiait pas le cours de l'infection <sup>292</sup>. Cela pourrait être lié à l'absence de signalisation de FGF19 chez ces souris avec pour conséquence un métabolisme des acides biliaires et une activité de FXR $\alpha$  dérégulés en particulier au niveau hépatique <sup>284</sup>. Ce modèle intéressant présente donc des limites majeures pour l'étude du rôle des acides biliaires dans le cycle du VHB.

Pour contourner ce problème de modèle nous avons eu recours à des souris C3H/HeN qui présentent un cycle entéro-hépatique des acides biliaires fonctionnel à l'opposé des souris à foie humanisé et que nous avons transduites avec le vecteur recombinant AAV2/8-VHB. Dans ce modèle, avec un inoculum précis de rAAV2/8-VHB, un traitement de 4 semaines avec l'agoniste de FXR $\alpha$  diminue de manière significative la charge virale et l'AgHBs dans le sérum des souris adultes de 12 semaines, confirmant que les agonistes de FXR $\alpha$  sont capables d'inhiber la production de certains marqueurs du VHB dans un modèle *in vivo*.

Nous avons également utilisé ce modèle pour tester l'effet de l'âge sur l'évolution de l'infection par le VHB. En effet, la voie métabolique des acides biliaires est régulée par une interaction complexe entre les hormones, les protéines de transport membranaire, les facteurs de transcription exprimés dans le foie et l'intestin et les bactéries de la flore intestinale qui s'établit lentement durant les premières années de la vie. Si en effet le niveau d'expression de FXR $\alpha$  et son activation sont critiques pour le VHB, on peut supposer que n'importe quelle variation de cet équilibre peut avoir des conséquences sur la réplication du VHB. Avec un inoculum précis de rAAV2/8-VHB dans ce même modèle de souris C3H/HeN, nous avons observé des différences de variations de la charge virale du VHB et de l'AgHBs entre les souris jeunes et adultes. En effet, dans les souris jeunes, un niveau constant et élevé de la réplication au cours des trois mois de l'expérience a été observé alors que dans les souris adultes les marqueurs rcDNA et AgHBs ont suivi une évolution biphasique caractérisée par un déclin initial et significatif suivi d'un rebond au niveau initial. Le traitement de 4 semaines avec l'agoniste de FXR $\alpha$  n'a pas d'effet sur l'évolution du VHB dans les souris jeunes mais a augmenté le déclin initial des titres de rcDNA et d'AgHBs et a empêché le rebond ultérieur chez les souris adultes.

Il est à noter que, comme dans le modèle dHepaRG, l'évolution de la sécrétion d'AgHBe dans les souris adultes en réponse au traitement avec un agoniste de FXR $\alpha$  diffère de l'AgHBs et du rcDNA. L'absence d'effet inhibiteur de l'agoniste de FXR $\alpha$  sur la sécrétion des AgHBe dans les souris adultes renforce l'hypothèse que la transcription de l'ARNpreC est vraisemblablement régulée de façon distincte par FXR $\alpha$  de celle de l'ARNpg.

En conclusion, nos expériences ont ainsi confirmé que le modèle de souris C3H/HeN infectées par un virus recombinant AAV2/8-VHB peut être un modèle intéressant pour l'étude *in vivo* du rôle du métabolisme des acides biliaires et de son évolution avec l'âge sur l'infection du VHB. La modulation de l'activité de FXR $\alpha$  n'influençant les résultats de l'infection que chez les souris adulte, nos résultats suggèrent que la maturation des voies physiologiques impacte les résultats de l'infection et que le métabolisme des acides biliaires – qui évolue lentement avec l'âge – pourrait être une des voies physiologiques à l'origine des différences d'histoire naturelle de l'infection par le VHB observées selon l'âge au moment de l'infection.

# PERSPECTIVES

Les résultats obtenus au cours de ce projet soulèvent de nouvelles questions. Pour poursuivre l'étude du rôle de FXR $\alpha$  dans l'infection par le VHB, on peut citer au moins trois axes de recherche importants. Un premier objectif, serait de confirmer plus en détail le rôle proviral de FXR $\alpha$  dans un modèle *in vivo* d'infection du VHB. Un second axe de recherche pourrait être d'explorer les mécanismes précis derrière le rôle proviral de FXR $\alpha$  dans l'infection du VHB. Enfin, un troisième serait de déterminer si la différence dans l'évolution de l'infection du VHB observée entre les souris jeunes et adultes est reliée à la différence de composition de la flore intestinale.

### **Axe 1 : Étude du rôle proviral de FXR $\alpha$ dans un modèle *in vivo* d'infection par le VHB.**

Nos expériences démontrent que FXR $\alpha$  est bien un facteur proviral pour l'infection par le VHB dans le modèle *in vitro* de cellules HepaRG différenciées et que le traitement aux agonistes de FXR $\alpha$  diminue la charge virale chez les souris adultes suggérant qu'il existe bien un rôle de FXR $\alpha$  *in vivo* sur le VHB. Ce qui pourrait dès lors être intéressant c'est de confirmer si FXR $\alpha$  a le même rôle proviral dans un modèle *in vivo*. Pour cela, il serait d'abord intéressant de comparer la cinétique d'infection du VHB entre des souris C57BL/6 FXR $^{+/+}$  et FXR $^{-/-}$  infectées par le virus recombinant AAV2/8-VHB. Nos expériences ayant montrés que dans les cellules dHepaRG infectées, l'extinction de FXR $\alpha$  empêche la formation et/ou la maintenance du cccDNA, il serait important dès lors de quantifier le cccDNA dans les foies de ces souris infectées. Pour cela, il est possible de se référer à une méthode de quantification de cccDNA, récemment décrite, qui permettrait de discriminer le cccDNA du VHB du génome recombinant AAV2/8-VHB<sup>293</sup>. Les autres marqueurs de l'infection par le VHB (AgHBs, AgHBe, rcDNA et ARNs intrahépatiques viraux) pourront être aussi quantifiés par les méthodes déjà utilisées dans nos précédentes expériences. Enfin, il serait intéressant de traiter avec le GW4064 ou un placebo, les souris FXR $^{-/-}$  infectées avec le virus recombinant AAV2/8-VHB pour confirmer si nos précédents résultats de diminution de production du rcDNA et d'AgHBs induits par le GW4064 sur les souris âgées de 12 semaines sont bien dépendants de FXR $\alpha$ .

### **Axe 2 : Étude du recrutement des interactants de FXR $\alpha$ sur le cccDNA.**

Une myriade de mécanismes est possible pour expliquer le rôle proviral de FXR $\alpha$  dans l'infection par le VHB. Parmi les mécanismes possibles, l'étude du rôle de FXR $\alpha$  dans le recrutement d'interactants déjà connus pour être des modulateurs de l'activité transcriptionnelle du cccDNA, à savoir la protéine virale HBx et l'histone désacétylase cellulaire SIRT1, pourrait être privilégiée. Pour cela, il serait intéressant d'effectuer des expériences de CHIP dans les modèles *in vitro* et dans les foies de souris infectées avec le virus recombinant AAV2/8-VHB en utilisant des anticorps dirigés contre FXR $\alpha$ , HBx et SIRT1. La fixation de ces trois protéines sur le génome viral, en particulier sur la région Enh2Cp et sur les promoteurs de plusieurs gènes cibles de FXR $\alpha$  seront comparées entre les souris infectées avec ou sans GW4064 et entre les souris infectées FXR $^{+/+}$  et FXR $^{-/-}$ .

### **Axe 3 : Étude de l'influence du microbiote intestinale sur la cinétique de l'infection du VHB.**

Nos expériences sur les souris jeunes et adultes mettent en exergue les différences de leurs cinétiques d'infection du AAV2/8-VHB et de leurs réponses au ligand de FXR $\alpha$ . On peut alors se demander si ces différences sont liées à une évolution particulière de la composition du microbiote intestinale qui s'établit au fil du temps. Afin d'explorer cette hypothèse, il serait intéressant dans un premier temps d'analyser à partir des selles la composition du microbiote intestinale dans les souris jeunes et adultes infectées avec le virus recombinant AAV2/8-VHB. Dans un second temps, il serait probablement intéressant d'induire une dysbiose intestinale par un traitement antibiotique des souris C3H/HeN infectées avec le virus recombinant AAV2/8-VHB. Par exemple, il a déjà été montré qu'un traitement à la vancomycine modulait le niveau d'expressions de plusieurs acides biliaires, diminuant en particulier la synthèse de l'acide muricholique ( $\beta$ -MCA) et de l'acide hyodéoxycholique, deux puissants agonistes de FXR $\alpha$  <sup>294</sup>.

Enfin, un agoniste spécifique de FXR $\alpha$ , le composé EYP001, a été développé par la société ENYO Pharma SA (Lyon, France) et sa première évaluation clinique sur des patients chroniquement infectés par le VHB a montré que des doses orales sont bien tolérées par les patients et qu'ils induisent un engagement prolongé de FXR $\alpha$  <sup>295</sup>.



# CONCLUSION

Ce projet de thèse a permis d'aboutir à trois résultats principaux : premièrement, la mise en avant d'une régulation réciproque entre la réplication du VHB et le récepteur nucléaire des acides biliaires FXR $\alpha$  ; deuxièmement, l'identification du rôle proviral de FXR $\alpha$  pour l'infection du VHB ; troisièmement, l'obtention d'un effet antiviral des agonistes de FXR $\alpha$  d'abord dans deux modèles *in vitro* de cellules HepaRG différenciées et d'hépatocytes primaires humains où l'effet est en partie dépendant de la protéine virale HBx et ensuite dans un modèle *in vivo* de souris adultes mais pas de souris jeunes. L'identification d'un lien éventuel entre l'évolution de l'infection par le VHB et les variations du métabolisme des acides biliaires parallèlement aux modifications de composition du microbiote intestinal pourrait permettre de mieux comprendre l'histoire naturelle du VHB.

Par ailleurs, le cccDNA du VHB représente une cible attractive pour les thérapies antivirales puisqu'il est la forme de persistance du VHB dans les hépatocytes et sert de base pour la synthèse des transcrits viraux. Plusieurs agonistes de FXR $\alpha$  sont actuellement évalués dans différentes phases d'essais cliniques pour des maladies métaboliques avec un bon profil de non toxicité. L'identification de FXR $\alpha$  comme facteur proviral pour le VHB et la capacité de ses ligands à moduler l'activité transcriptionnelle du cccDNA suggère que ces ligands pourraient représenter une nouvelle classe de molécules thérapeutiques ayant des retombées sur l'obtention d'une cure fonctionnelle pour les patients chroniquement infectés par le VHB.

# **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Blumberg, B. S., Alter, H. J. & Visnich, S. A 'NEW' ANTIGEN IN LEUKEMIA SERA. *JAMA* **191**, 541–546 (1965).
2. Dane, D. S., Cameron, C. H. & Briggs, M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet Lond. Engl.* **1**, 695–698 (1970).
3. Summers, J., O'Connell, A. & Millman, I. Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 4597–4601 (1975).
4. Galibert, F., Mandart, E., Fitoussi, F., Tiollais, P. & Charnay, P. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature* **281**, 646–650 (1979).
5. Summers, J., Smolec, J. M. & Snyder, R. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 4533–4537 (1978).
6. Testut, P. *et al.* A new hepadnavirus endemic in arctic ground squirrels in Alaska. *J. Virol.* **70**, 4210–4219 (1996).
7. Marion, P. L., Oshiro, L. S., Regnery, D. C., Scullard, G. H. & Robinson, W. S. A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 2941–2945 (1980).
8. Grethe, S., Heckel, J. O., Rietschel, W. & Hufert, F. T. Molecular epidemiology of hepatitis B virus variants in nonhuman primates. *J. Virol.* **74**, 5377–5381 (2000).
9. Vaudin, M., Wolstenholme, A. J., Tsiquaye, K. N., Zuckerman, A. J. & Harrison, T. J. The complete nucleotide sequence of the genome of a hepatitis B virus isolated from a naturally infected chimpanzee. *J. Gen. Virol.* **69 (Pt 6)**, 1383–1389 (1988).
10. Norder, H., Ebert, J. W., Fields, H. A., Mushahwar, I. K. & Magnius, L. O. Complete sequencing of a gibbon hepatitis B virus genome reveals a unique genotype distantly related to the chimpanzee hepatitis B virus. *Virology* **218**, 214–223 (1996).
11. Warren, K. S., Heeney, J. L., Swan, R. A., Heriyanto, null & Verschoor, E. J. A new group of hepadnaviruses naturally infecting orangutans (*Pongo pygmaeus*). *J. Virol.* **73**, 7860–7865 (1999).
12. Lanford, R. E., Chavez, D., Brasky, K. M., Burns, R. B. & Rico-Hesse, R. Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 5757–5761 (1998).
13. Drexler, J. F. *et al.* Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 16151–16156 (2013).
14. Mason, W. S., Seal, G. & Summers, J. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J. Virol.* **36**, 829–836 (1980).
15. Sprengel, R., Kaleta, E. F. & Will, H. Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J. Virol.* **62**, 3832–3839 (1988).
16. Pult, I. *et al.* Identification and analysis of a new hepadnavirus in white storks. *Virology* **289**, 114–128 (2001).
17. Chang, S. F. *et al.* A new avian hepadnavirus infecting snow geese (*Anser caerulescens*) produces a significant fraction of virions containing single-stranded DNA. *Virology* **262**, 39–54 (1999).
18. Prassolov, A. *et al.* New hepatitis B virus of cranes that has an unexpected broad host range. *J. Virol.* **77**, 1964–1976 (2003).
19. Stanaway, J. D. *et al.* The global burden of viral hepatitis from 1990 to 2013: findings from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Lond. Engl.* **388**, 1081–1088 (2016).

20. GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Lond. Engl.* **388**, 1459–1544 (2016).
21. WHO | Hepatitis B. WHO Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>.
22. Hou, J., Liu, Z. & Gu, F. Epidemiology and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. *Int. J. Med. Sci.* **2**, 50–57 (2005).
23. El-Serag, H. B. Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* **142**, 1264-1273.e1 (2012).
24. WHO | Hepatitis B: How can I protect myself? WHO Available at: <http://www.who.int/features/qa/11/en/>.
25. Blumberg, B. S. *et al.* The relation of infection with the hepatitis B agent to primary hepatic carcinoma. *Am. J. Pathol.* **81**, 669–682 (1975).
26. Shi, J., Zhu, L., Liu, S. & Xie, W.-F. A meta-analysis of case-control studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma in China. *Br. J. Cancer* **92**, 607–612 (2005).
27. Parkin, D. M. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int. J. Cancer* **118**, 3030–3044 (2006).
28. Kao, J.-H. Hepatitis B viral genotypes: clinical relevance and molecular characteristics. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **17**, 643–650 (2002).
29. Lin, C.-L. & Kao, J.-H. Hepatitis B virus genotypes and variants. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **5**, a021436 (2015).
30. Sunbul, M. Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance. *World J. Gastroenterol. WJG* **20**, 5427–5434 (2014).
31. Lau, J. Y. & Wright, T. L. Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. *Lancet Lond. Engl.* **342**, 1335–1340 (1993).
32. Nassal, M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut* **64**, 1972–1984 (2015).
33. Wynne, S. A., Crowther, R. A. & Leslie, A. G. The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. *Mol. Cell* **3**, 771–780 (1999).
34. Bruss, V. Hepatitis B virus morphogenesis. *World J. Gastroenterol.* **13**, 65–73 (2007).
35. Gerlich, W. H. & Robinson, W. S. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* **21**, 801–809 (1980).
36. Nassal, M. Hepatitis B viruses: Reverse transcription a different way. *Virus Res.* **134**, 235–249 (2008).
37. Ponsel, D. & Bruss, V. Mapping of amino acid side chains on the surface of hepatitis B virus capsids required for envelopment and virion formation. *J. Virol.* **77**, 416–422 (2003).
38. Nassal, M. Hepatitis B virus replication: novel roles for virus-host interactions. *Intervirology* **42**, 100–116 (1999).
39. Hepatitis B virus subtype ayw, complete genome. (1997). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/U95551.1>.
40. Lamas Longarela, O. *et al.* Proteoglycans act as cellular hepatitis delta virus attachment receptors. *PloS One* **8**, e58340 (2013).
41. Schulze, A., Gripon, P. & Urban, S. Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatol. Baltim. Md* **46**, 1759–1768 (2007).

42. Zahn, A. & Allain, J.-P. Hepatitis C virus and hepatitis B virus bind to heparin: purification of largely IgG-free virions from infected plasma by heparin chromatography. *J. Gen. Virol.* **86**, 677–685 (2005).
43. Yan, H. *et al.* Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife* **1**, e00049 (2012).
44. Hong, X., Kim, E. S. & Guo, H. Epigenetic regulation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA: Implications for epigenetic therapy against chronic hepatitis B. *Hepatology*. *Baltimore, Md* **66**, 2066–2077 (2017).
45. Macovei, A. *et al.* Hepatitis B virus requires intact caveolin-1 function for productive infection in HepaRG cells. *J. Virol.* **84**, 243–253 (2010).
46. Huang, H.-C., Chen, C.-C., Chang, W.-C., Tao, M.-H. & Huang, C. Entry of hepatitis B virus into immortalized human primary hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. *J. Virol.* **86**, 9443–9453 (2012).
47. Macovei, A., Petrareanu, C., Lazar, C., Florian, P. & Branza-Nichita, N. Regulation of hepatitis B virus infection by Rab5, Rab7, and the endolysosomal compartment. *J. Virol.* **87**, 6415–6427 (2013).
48. Kann, M., Schmitz, A. & Rabe, B. Intracellular transport of hepatitis B virus. *World J. Gastroenterol.* **13**, 39–47 (2007).
49. Li, H.-C. *et al.* Nuclear export and import of human hepatitis B virus capsid protein and particles. *PLoS Pathog.* **6**, e1001162 (2010).
50. Rabe, B. *et al.* Nuclear Entry of Hepatitis B Virus Capsids Involves Disintegration to Protein Dimers followed by Nuclear Reassociation to Capsids. *PLoS Pathog.* **5**, (2009).
51. Schmitz, A. *et al.* Nucleoporin 153 arrests the nuclear import of hepatitis B virus capsids in the nuclear basket. *PLoS Pathog.* **6**, e1000741 (2010).
52. Kann, M., Sodeik, B., Vlachou, A., Gerlich, W. H. & Helenius, A. Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* **145**, 45–55 (1999).
53. Zoulim, F. New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA. *J. Hepatology*. **42**, 302–308 (2005).
54. Gao, W. & Hu, J. Formation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA: removal of genome-linked protein. *J. Virol.* **81**, 6164–6174 (2007).
55. Tuttleman, J. S., Pourcel, C. & Summers, J. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell* **47**, 451–460 (1986).
56. Königer, C. *et al.* Involvement of the host DNA-repair enzyme TDP2 in formation of the covalently closed circular DNA persistence reservoir of hepatitis B viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, E4244–4253 (2014).
57. Cui, X. *et al.* Does Tyrosyl DNA Phosphodiesterase-2 Play a Role in Hepatitis B Virus Genome Repair? *PloS One* **10**, e0128401 (2015).
58. Qi, Y. *et al.* DNA Polymerase  $\kappa$  Is a Key Cellular Factor for the Formation of Covalently Closed Circular DNA of Hepatitis B Virus. *PLoS Pathog.* **12**, e1005893 (2016).
59. Ogi, T. & Lehmann, A. R. The Y-family DNA polymerase kappa (pol kappa) functions in mammalian nucleotide-excision repair. *Nat. Cell Biol.* **8**, 640–642 (2006).
60. Ji, M. & Hu, K. Recent advances in the study of hepatitis B virus covalently closed circular DNA. *Virol. Sin.* **32**, 454–464 (2017).
61. Bock, C. T. *et al.* Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome. *J. Mol. Biol.* **307**, 183–196 (2001).
62. Mason, W. S., Aldrich, C., Summers, J. & Taylor, J. M. Asymmetric replication of duck hepatitis B virus DNA in liver cells: Free minus-strand DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 3997–4001 (1982).



63. O'Connell, A. P., Urban, M. K. & London, W. T. Naturally occurring infection of Pekin duck embryos by duck hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 1703–1706 (1983).
64. Weiser, B., Ganem, D., Seeger, C. & Varmus, H. E. Closed circular viral DNA and asymmetrical heterogeneous forms in livers from animals infected with ground squirrel hepatitis virus. *J. Virol.* **48**, 1–9 (1983).
65. Miller, R. H. & Robinson, W. S. Hepatitis B virus DNA forms in nuclear and cytoplasmic fractions of infected human liver. *Virology* **137**, 390–399 (1984).
66. Quasdorff, M. & Protzer, U. Control of hepatitis B virus at the level of transcription. *J. Viral Hepat.* **17**, 527–536 (2010).
67. Tang, H. & McLachlan, A. Transcriptional regulation of hepatitis B virus by nuclear hormone receptors is a critical determinant of viral tropism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 1841–1846 (2001).
68. Su, T. S. *et al.* Hepatitis B virus transcript produced by RNA splicing. *J. Virol.* **63**, 4011–4018 (1989).
69. Suzuki, T., Kajino, K., Masui, N., Saito, I. & Miyamura, T. Alternative splicing of hepatitis B virus RNAs in HepG2 cells transfected with the viral DNA. *Virology* **179**, 881–885 (1990).
70. Rosmorduc, O. *et al.* In vivo and in vitro expression of defective hepatitis B virus particles generated by spliced hepatitis B virus RNA. *Hepatology. Baltim. Md* **22**, 10–19 (1995).
71. Sommer, G. & Heise, T. Posttranscriptional control of HBV gene expression. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **13**, 5533–5547 (2008).
72. Schwalbe, M. *et al.* Solution structure of stem-loop alpha of the hepatitis B virus post-transcriptional regulatory element. *Nucleic Acids Res.* **36**, 1681–1689 (2008).
73. Günther, S., Sommer, G., Iwanska, A. & Will, H. Heterogeneity and common features of defective hepatitis B virus genomes derived from spliced pregenomic RNA. *Virology* **238**, 363–371 (1997).
74. Wu, H. L. *et al.* Characterization and genetic analysis of alternatively spliced transcripts of hepatitis B virus in infected human liver tissues and transfected HepG2 cells. *J. Virol.* **65**, 1680–1686 (1991).
75. Soussan, P. *et al.* In vivo expression of a new hepatitis B virus protein encoded by a spliced RNA. *J. Clin. Invest.* **105**, 55–60 (2000).
76. Soussan, P. *et al.* The expression of hepatitis B spliced protein (HBSP) encoded by a spliced hepatitis B virus RNA is associated with viral replication and liver fibrosis. *J. Hepatology* **38**, 343–348 (2003).
77. Terré, S., Petit, M. A. & Bréchet, C. Defective hepatitis B virus particles are generated by packaging and reverse transcription of spliced viral RNAs in vivo. *J. Virol.* **65**, 5539–5543 (1991).
78. Lee, G. H., Wasser, S. & Lim, S. G. Hepatitis B pregenomic RNA splicing--the products, the regulatory mechanisms and its biological significance. *Virus Res.* **136**, 1–7 (2008).
79. Kremsdorf, D., Soussan, P., Paterlini-Brechot, P. & Brechet, C. Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: paradigms for viral-related human carcinogenesis. *Oncogene* **25**, 3823–3833 (2006).
80. Bayliss, J. *et al.* Hepatitis B virus splicing is enhanced prior to development of hepatocellular carcinoma. *J. Hepatology* **59**, 1022–1028 (2013).
81. Mancini-Bourgine, M. *et al.* Hepatitis B virus splice-generated protein induces T-cell responses in HLA-transgenic mice and hepatitis B virus-infected patients. *J. Virol.* **81**,

4963–4972 (2007).

82. Dawson, M. A. The cancer epigenome: Concepts, challenges, and therapeutic opportunities. *Science* **355**, 1147–1152 (2017).
83. Byrd, J. C. *et al.* A phase 1 and pharmacodynamic study of depsipeptide (FK228) in chronic lymphocytic leukemia and acute myeloid leukemia. *Blood* **105**, 959–967 (2005).
84. Tessarz, P. & Kouzarides, T. Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 703–708 (2014).
85. Roberts, T. C., Morris, K. V. & Weinberg, M. S. Perspectives on the mechanism of transcriptional regulation by long non-coding RNAs. *Epigenetics* **9**, 13–20 (2014).
86. Venkatesh, S. & Workman, J. L. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 178–189 (2015).
87. Zhou, V. W., Goren, A. & Bernstein, B. E. Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 7–18 (2011).
88. Tropberger, P. *et al.* Mapping of histone modifications in episomal HBV cccDNA uncovers an unusual chromatin organization amenable to epigenetic manipulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E5715–5724 (2015).
89. Pollicino, T. *et al.* Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones. *Gastroenterology* **130**, 823–837 (2006).
90. Liu, F. *et al.* Alpha-interferon suppresses hepadnavirus transcription by altering epigenetic modification of cccDNA minichromosomes. *PLoS Pathog.* **9**, e1003613 (2013).
91. Zhang, Y. *et al.* Comparative analysis of CpG islands among HBV genotypes. *PLoS One* **8**, e56711 (2013).
92. Kim, J.-W. *et al.* Replicative activity of hepatitis B virus is negatively associated with methylation of covalently closed circular DNA in advanced hepatitis B virus infection. *Intervirology* **54**, 316–325 (2011).
93. Shlomai, A. & Shaul, Y. The ‘metabolovirus’ model of hepatitis B virus suggests nutritional therapy as an effective anti-viral weapon. *Med. Hypotheses* **71**, 53–57 (2008).
94. Geier, A. Hepatitis B virus: the ‘metabolovirus’ highjacks cholesterol and bile acid metabolism. *Hepatol. Baltim. Md* **60**, 1458–1460 (2014).
95. Sitterlin, D. *et al.* Interaction of the UV-damaged DNA-binding protein with hepatitis B virus X protein is conserved among mammalian hepadnaviruses and restricted to transactivation-proficient X-insertion mutants. *J. Virol.* **71**, 6194–6199 (1997).
96. van Hemert, F. J. *et al.* Protein X of hepatitis B virus: origin and structure similarity with the central domain of DNA glycosylase. *PLoS One* **6**, e23392 (2011).
97. Lucifora, J. *et al.* Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J. Hepatol.* **55**, 996–1003 (2011).
98. Tsuge, M. *et al.* HBx protein is indispensable for development of viraemia in human hepatocyte chimeric mice. *J. Gen. Virol.* **91**, 1854–1864 (2010).
99. Levrero, M. *et al.* Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* **51**, 581–592 (2009).
100. Ducroux, A. *et al.* The Tudor domain protein Spindlin1 is involved in intrinsic antiviral defense against incoming hepatitis B Virus and herpes simplex virus type 1. *PLoS Pathog.* **10**, e1004343 (2014).
101. Rivière, L. *et al.* HBx relieves chromatin-mediated transcriptional repression of hepatitis B viral cccDNA involving SETDB1 histone methyltransferase. *J. Hepatol.* **63**, 1093–1102 (2015).

102. Quétier, I. *et al.* Hepatitis B virus HBx protein impairs liver regeneration through enhanced expression of IL-6 in transgenic mice. *J. Hepatol.* **59**, 285–291 (2013).
103. Feitelson, M. A., Bonamassa, B. & Arzumanyan, A. The roles of hepatitis B virus-encoded X protein in virus replication and the pathogenesis of chronic liver disease. *Expert Opin. Ther. Targets* **18**, 293–306 (2014).
104. Quetier, I. *et al.* C-terminal-truncated hepatitis B virus X protein enhances the development of diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinogenesis. *J. Gen. Virol.* **96**, 614–625 (2015).
105. Wu, Z.-J., Zhu, Y., Huang, D.-R. & Wang, Z.-Q. Constructing the HBV-human protein interaction network to understand the relationship between HBV and hepatocellular carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **29**, 146 (2010).
106. Iovine, B., Iannella, M. L. & Bevilacqua, M. A. Damage-specific DNA binding protein 1 (DDB1): a protein with a wide range of functions. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43**, 1664–1667 (2011).
107. Li, T., Robert, E. I., van Breugel, P. C., Strubin, M. & Zheng, N. A promiscuous alpha-helical motif anchors viral hijackers and substrate receptors to the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase machinery. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 105–111 (2010).
108. Leupin, O., Bontron, S., Schaeffer, C. & Strubin, M. Hepatitis B virus X protein stimulates viral genome replication via a DDB1-dependent pathway distinct from that leading to cell death. *J. Virol.* **79**, 4238–4245 (2005).
109. Minor, M. M. & Slagle, B. L. Hepatitis B virus HBx protein interactions with the ubiquitin proteasome system. *Viruses* **6**, 4683–4702 (2014).
110. Sitterlin, D., Bergametti, F., Tiollais, P., Tennant, B. C. & Transy, C. Correct binding of viral X protein to UVDDDB-p127 cellular protein is critical for efficient infection by hepatitis B viruses. *Oncogene* **19**, 4427–4431 (2000).
111. Shiyanov, P., Nag, A. & Raychaudhuri, P. Cullin 4A associates with the UV-damaged DNA-binding protein DDB. *J. Biol. Chem.* **274**, 35309–35312 (1999).
112. Didcock, L., Young, D. F., Goodbourn, S. & Randall, R. E. The V protein of simian virus 5 inhibits interferon signalling by targeting STAT1 for proteasome-mediated degradation. *J. Virol.* **73**, 9928–9933 (1999).
113. Hrecka, K. *et al.* Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature* **474**, 658–661 (2011).
114. Decorsière, A. *et al.* Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor. *Nature* **531**, 386–389 (2016).
115. Murphy, C. M. *et al.* Hepatitis B Virus X Protein Promotes Degradation of SMC5/6 to Enhance HBV Replication. *Cell Rep.* **16**, 2846–2854 (2016).
116. van Breugel, P. C. *et al.* Hepatitis B virus X protein stimulates gene expression selectively from extrachromosomal DNA templates. *Hepatol. Baltim. Md* **56**, 2116–2124 (2012).
117. Colgrove, R., Simon, G. & Ganem, D. Transcriptional activation of homologous and heterologous genes by the hepatitis B virus X gene product in cells permissive for viral replication. *J. Virol.* **63**, 4019–4026 (1989).
118. Jeppsson, K. *et al.* The chromosomal association of the Smc5/6 complex depends on cohesion and predicts the level of sister chromatid entanglement. *PLoS Genet.* **10**, e1004680 (2014).
119. Jeppsson, K., Kanno, T., Shirahige, K. & Sjögren, C. The maintenance of chromosome structure: positioning and functioning of SMC complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 601–614 (2014).
120. Kanno, T., Berta, D. G. & Sjögren, C. The Smc5/6 Complex Is an ATP-Dependent

- Intermolecular DNA Linker. *Cell Rep.* **12**, 1471–1482 (2015).
121. Murphy, C. M. *et al.* Hepatitis B Virus X Protein Promotes Degradation of SMC5/6 to Enhance HBV Replication. *Cell Rep.* **16**, 2846–2854 (2016).
  122. Kajino, K. *et al.* Woodchuck hepatitis virus infections: very rapid recovery after a prolonged viremia and infection of virtually every hepatocyte. *J. Virol.* **68**, 5792–5803 (1994).
  123. Dandri, M., Burda, M. R., Will, H. & Petersen, J. Increased hepatocyte turnover and inhibition of woodchuck hepatitis B virus replication by adefovir in vitro do not lead to reduction of the closed circular DNA. *Hepatology*. *Baltim. Md* **32**, 139–146 (2000).
  124. Zhang, Y.-Y. *et al.* Single-cell analysis of covalently closed circular DNA copy numbers in a hepadnavirus-infected liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 12372–12377 (2003).
  125. Laras, A., Koskinas, J., Dimou, E., Kostamena, A. & Hadziyannis, S. J. Intrahepatic levels and replicative activity of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronically infected patients. *Hepatology*. *Baltim. Md* **44**, 694–702 (2006).
  126. Wursthorn, K. *et al.* Peginterferon alpha-2b plus adefovir induce strong cccDNA decline and HBsAg reduction in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*. *Baltim. Md* **44**, 675–684 (2006).
  127. Zhu, Y. *et al.* Kinetics of hepadnavirus loss from the liver during inhibition of viral DNA synthesis. *J. Virol.* **75**, 311–322 (2001).
  128. Addison, W. R. *et al.* Half-life of the duck hepatitis B virus covalently closed circular DNA pool in vivo following inhibition of viral replication. *J. Virol.* **76**, 6356–6363 (2002).
  129. Moraleda, G. *et al.* Lack of effect of antiviral therapy in nondividing hepatocyte cultures on the closed circular DNA of woodchuck hepatitis virus. *J. Virol.* **71**, 9392–9399 (1997).
  130. Murray, J. M., Wieland, S. F., Purcell, R. H. & Chisari, F. V. Dynamics of hepatitis B virus clearance in chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 17780–17785 (2005).
  131. Rehmann, B., Ferrari, C., Pasquinelli, C. & Chisari, F. V. The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nat. Med.* **2**, 1104–1108 (1996).
  132. Wu, T. T., Coates, L., Aldrich, C. E., Summers, J. & Mason, W. S. In hepatocytes infected with duck hepatitis B virus, the template for viral RNA synthesis is amplified by an intracellular pathway. *Virology* **175**, 255–261 (1990).
  133. Chisari, F. V. & Ferrari, C. Hepatitis B virus immunopathology. *Springer Semin. Immunopathol.* **17**, 261–281 (1995).
  134. Macdonald, R. A. 'Lifespan' of liver cells. Autoradio-graphic study using tritiated thymidine in normal, cirrhotic, and partially hepatectomized rats. *Arch. Intern. Med.* **107**, 335–343 (1961).
  135. Magami, Y. *et al.* Cell proliferation and renewal of normal hepatocytes and bile duct cells in adult mouse liver. *Liver* **22**, 419–425 (2002).
  136. Guo, J. T. *et al.* Apoptosis and regeneration of hepatocytes during recovery from transient hepadnavirus infections. *J. Virol.* **74**, 1495–1505 (2000).
  137. Guo, J.-T. *et al.* Conditional replication of duck hepatitis B virus in hepatoma cells. *J. Virol.* **77**, 1885–1893 (2003).
  138. Lutgehetmann, M. *et al.* In vivo proliferation of hepadnavirus-infected hepatocytes induces loss of covalently closed circular DNA in mice. *Hepatology*. *Baltim. Md* **52**, 16–24 (2010).
  139. Reaiche-Miller, G. Y. *et al.* Duck hepatitis B virus covalently closed circular DNA



- appears to survive hepatocyte mitosis in the growing liver. *Virology* **446**, 357–364 (2013).
140. Ballestas, M. E., Chatis, P. A. & Kaye, K. M. Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen. *Science* **284**, 641–644 (1999).
141. Hung, S. C., Kang, M. S. & Kieff, E. Maintenance of Epstein-Barr virus (EBV) oriP-based episomes requires EBV-encoded nuclear antigen-1 chromosome-binding domains, which can be replaced by high-mobility group-I or histone H1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 1865–1870 (2001).
142. You, J., Croyle, J. L., Nishimura, A., Ozato, K. & Howley, P. M. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell* **117**, 349–360 (2004).
143. You, J. *et al.* Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen interacts with bromodomain protein Brd4 on host mitotic chromosomes. *J. Virol.* **80**, 8909–8919 (2006).
144. Pollack, J. R. & Ganem, D. An RNA stem-loop structure directs hepatitis B virus genomic RNA encapsidation. *J. Virol.* **67**, 3254–3263 (1993).
145. Beck, J. & Nassal, M. Hepatitis B virus replication. *World J. Gastroenterol.* **13**, 48–64 (2007).
146. Nassal, M. Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. *Virus Res.* **134**, 235–249 (2008).
147. Cai, C. W. *et al.* Hepatitis B virus replication is blocked by a 2-hydroxyisoquinoline-1,3(2H,4H)-dione (HID) inhibitor of the viral ribonuclease H activity. *Antiviral Res.* **108**, 48–55 (2014).
148. Lieber, M. R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 181–211 (2010).
149. Waters, C. A., Strande, N. T., Wyatt, D. W., Pryor, J. M. & Ramsden, D. A. Nonhomologous end joining: a good solution for bad ends. *DNA Repair* **17**, 39–51 (2014).
150. Yang, W. & Summers, J. Integration of hepadnavirus DNA in infected liver: evidence for a linear precursor. *J. Virol.* **73**, 9710–9717 (1999).
151. Sung, W.-K. *et al.* Genome-wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma. *Nat. Genet.* **44**, 765–769 (2012).
152. Patient, R., Hourieux, C. & Roingard, P. Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles. *Cell. Microbiol.* **11**, 1561–1570 (2009).
153. Garcia, T. *et al.* Drastic reduction in the production of subviral particles does not impair hepatitis B virus virion secretion. *J. Virol.* **83**, 11152–11165 (2009).
154. Prange, R. Host factors involved in hepatitis B virus maturation, assembly, and egress. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* **201**, 449–461 (2012).
155. Tuttleman, J. S., Pugh, J. C. & Summers, J. W. In vitro experimental infection of primary duck hepatocyte cultures with duck hepatitis B virus. *J. Virol.* **58**, 17–25 (1986).
156. Seitz, S. *et al.* A Slow Maturation Process Renders Hepatitis B Virus Infectious. *Cell Host Microbe* **20**, 25–35 (2016).
157. Ramière, C. *et al.* Evolution of the incidence of hepatitis B virus infection and immunization rates in a large French cohort born between 1960 and 1994. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **22**, 889.e1–889.e7 (2016).
158. Schweitzer, A., Horn, J., Mikolajczyk, R. T., Krause, G. & Ott, J. J. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *Lancet Lond. Engl.* **386**, 1546–1555 (2015).

159. Tian, Y., Kuo, C.-F., Akbari, O. & Ou, J.-H. J. Maternal-Derived Hepatitis B Virus e Antigen Alters Macrophage Function in Offspring to Drive Viral Persistence after Vertical Transmission. *Immunity* **44**, 1204–1214 (2016).
160. Hong, M. *et al.* Trained immunity in newborn infants of HBV-infected mothers. *Nat. Commun.* **6**, 6588 (2015).
161. Zeng, Z. *et al.* Interferon- $\gamma$  facilitates hepatic antiviral T cell retention for the maintenance of liver-induced systemic tolerance. *J. Exp. Med.* **213**, 1079–1093 (2016).
162. Lang, T. *et al.* The hepatitis B e antigen (HBeAg) targets and suppresses activation of the toll-like receptor signaling pathway. *J. Hepatol.* **55**, 762–769 (2011).
163. Xu, Y. *et al.* HBsAg inhibits TLR9-mediated activation and IFN- $\alpha$  production in plasmacytoid dendritic cells. *Mol. Immunol.* **46**, 2640–2646 (2009).
164. Pallett, L. J. *et al.* Metabolic regulation of hepatitis B immunopathology by myeloid-derived suppressor cells. *Nat. Med.* **21**, 591–600 (2015).
165. European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu & European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* **67**, 370–398 (2017).
166. European Association For The Study Of The Liver. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* **57**, 167–185 (2012).
167. Mason, W. S. *et al.* HBV DNA Integration and Clonal Hepatocyte Expansion in Chronic Hepatitis B Patients Considered Immune Tolerant. *Gastroenterology* **151**, 986–998.e4 (2016).
168. Maupas, P., Goudeau, A., Coursaget, P., Drucker, J. & Bagros, P. Immunisation against hepatitis B in man. *Lancet Lond. Engl.* **1**, 1367–1370 (1976).
169. Michel, M.-L. & Tiollais, P. Hepatitis B vaccines: protective efficacy and therapeutic potential. *Pathol. Biol. (Paris)* **58**, 288–295 (2010).
170. Clements, C. J. *et al.* Global control of hepatitis B virus: does treatment-induced antigenic change affect immunization? *Bull. World Health Organ.* **88**, 66–73 (2010).
171. Mendy, M. *et al.* Envelope protein variability among HBV-Infected asymptomatic carriers and immunized children with breakthrough infections. *J. Med. Virol.* **80**, 1537–1546 (2008).
172. Chang, M.-H. Breakthrough HBV infection in vaccinated children in Taiwan: surveillance for HBV mutants. *Antivir. Ther.* **15**, 463–469 (2010).
173. Lai, M.-W. *et al.* Increased seroprevalence of HBV DNA with mutations in the s gene among individuals greater than 18 years old after complete vaccination. *Gastroenterology* **143**, 400–407 (2012).
174. Zeisel, M. B. *et al.* Towards an HBV cure: state-of-the-art and unresolved questions--report of the ANRS workshop on HBV cure. *Gut* **64**, 1314–1326 (2015).
175. Zoulim, F., Lebossé, F. & Levrero, M. Current treatments for chronic hepatitis B virus infections. *Curr. Opin. Virol.* **18**, 109–116 (2016).
176. Yuen, M.-F. & Lai, C.-L. Treatment of chronic hepatitis B: Evolution over two decades. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **26 Suppl 1**, 138–143 (2011).
177. Baumert, T. F. *et al.* Entry of hepatitis B and C viruses - recent progress and future impact. *Curr. Opin. Virol.* **4**, 58–65 (2014).
178. Urban, S., Bartenschlager, R., Kubitz, R. & Zoulim, F. Strategies to inhibit entry of HBV and HDV into hepatocytes. *Gastroenterology* **147**, 48–64 (2014).
179. Cai, D. *et al.* Identification of disubstituted sulfonamide compounds as specific inhibitors of hepatitis B virus covalently closed circular DNA formation. *Antimicrob.*



*Agents Chemother.* **56**, 4277–4288 (2012).

180. Zlotnick, A. *et al.* Core protein: A pleiotropic keystone in the HBV lifecycle. *Antiviral Res.* **121**, 82–93 (2015).

181. Billioud, G., Pichoud, C., Puerstinger, G., Neyts, J. & Zoulim, F. The main hepatitis B virus (HBV) mutants resistant to nucleoside analogs are susceptible in vitro to non-nucleoside inhibitors of HBV replication. *Antiviral Res.* **92**, 271–276 (2011).

182. van der Aa, E., van Montfoort, N. & Woltman, A. M. BDCA3(+)CLEC9A(+) human dendritic cell function and development. *Semin. Cell Dev. Biol.* **41**, 39–48 (2015).

183. Dalod, M., Chelbi, R., Malissen, B. & Lawrence, T. Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *EMBO J.* **33**, 1104–1116 (2014).

184. Lanford, R. E. *et al.* GS-9620, an oral agonist of Toll-like receptor-7, induces prolonged suppression of hepatitis B virus in chronically infected chimpanzees. *Gastroenterology* **144**, 1508–1517, 1517.e1–10 (2013).

185. Gish, R. G. *et al.* Synthetic RNAi triggers and their use in chronic hepatitis B therapies with curative intent. *Antiviral Res.* **121**, 97–108 (2015).

186. Lucifora, J. *et al.* Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science* **343**, 1221–1228 (2014).

187. Bloom, K., Ely, A., Mussolino, C., Cathomen, T. & Arbuthnot, P. Inactivation of hepatitis B virus replication in cultured cells and in vivo with engineered transcription activator-like effector nucleases. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **21**, 1889–1897 (2013).

188. Chen, J. *et al.* An efficient antiviral strategy for targeting hepatitis B virus genome using transcription activator-like effector nucleases. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **22**, 303–311 (2014).

189. Zimmerman, K. A., Fischer, K. P., Joyce, M. A. & Tyrrell, D. L. J. Zinc finger proteins designed to specifically target duck hepatitis B virus covalently closed circular DNA inhibit viral transcription in tissue culture. *J. Virol.* **82**, 8013–8021 (2008).

190. Hoeksema, K. A. & Tyrrell, D. L. J. Inhibition of viral transcription using designed zinc finger proteins. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **649**, 97–116 (2010).

191. Weber, N. D. *et al.* AAV-mediated delivery of zinc finger nucleases targeting hepatitis B virus inhibits active replication. *PloS One* **9**, e97579 (2014).

192. Seeger, C. & Sohn, J. A. Targeting Hepatitis B Virus With CRISPR/Cas9. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **3**, e216 (2014).

193. Lin, S.-R. *et al.* The CRISPR/Cas9 System Facilitates Clearance of the Intrahepatic HBV Templates In Vivo. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **3**, e186 (2014).

194. Dong, C. *et al.* Targeting hepatitis B virus cccDNA by CRISPR/Cas9 nuclease efficiently inhibits viral replication. *Antiviral Res.* **118**, 110–117 (2015).

195. Liu, X., Hao, R., Chen, S., Guo, D. & Chen, Y. Inhibition of hepatitis B virus by the CRISPR/Cas9 system via targeting the conserved regions of the viral genome. *J. Gen. Virol.* **96**, 2252–2261 (2015).

196. Ramanan, V. *et al.* CRISPR/Cas9 cleavage of viral DNA efficiently suppresses hepatitis B virus. *Sci. Rep.* **5**, 10833 (2015).

197. Ren, Q. *et al.* A Dual-reporter system for real-time monitoring and high-throughput CRISPR/Cas9 library screening of the hepatitis C virus. *Sci. Rep.* **5**, 8865 (2015).

198. Seeger, C. & Sohn, J. A. Complete Spectrum of CRISPR/Cas9-induced Mutations on HBV cccDNA. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **24**, 1258–1266 (2016).

199. Wieland H. The chemistry of the bile acids. *Nobel Lect. Chem. 1922–1941 Elsevier Publ. Co. Amst. Neth.* 94–102 (1928).

200. de Aguiar Vallim, T. Q., Tarling, E. J. & Edwards, P. A. Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. *Cell Metab.* **17**, 657–669 (2013).
201. Anderson, K. E., Kok, E. & Javitt, N. B. Bile acid synthesis in man: metabolism of 7 - hydroxycholesterol- 14 C and 26-hydroxycholesterol- 3 H. *J. Clin. Invest.* **51**, 112–117 (1972).
202. Ishibashi, S., Schwarz, M., Frykman, P. K., Herz, J. & Russell, D. W. Disruption of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene in mice. I. Postnatal lethality reversed by bile acid and vitamin supplementation. *J. Biol. Chem.* **271**, 18017–18023 (1996).
203. Schwarz, M. *et al.* Disruption of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene in mice. II. Bile acid deficiency is overcome by induction of oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **271**, 18024–18031 (1996).
204. Kullak-Ublick, G. A., Stieger, B., Hagenbuch, B. & Meier, P. J. Hepatic transport of bile salts. *Semin. Liver Dis.* **20**, 273–292 (2000).
205. Seol, W., Choi, H. S. & Moore, D. D. Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **9**, 72–85 (1995).
206. Forman, B. M. *et al.* Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell* **81**, 687–693 (1995).
207. Makishima, M. *et al.* Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* **284**, 1362–1365 (1999).
208. Parks, D. J. *et al.* Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* **284**, 1365–1368 (1999).
209. Wang, H., Chen, J., Hollister, K., Sowers, L. C. & Forman, B. M. Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol. Cell* **3**, 543–553 (1999).
210. Sayin, S. I. *et al.* Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell Metab.* **17**, 225–235 (2013).
211. Zhang, Y. & Edwards, P. A. FXR signaling in metabolic disease. *FEBS Lett.* **582**, 10–18 (2008).
212. Calkin, A. C. & Tontonoz, P. Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 213–224 (2012).
213. Sonoda, J., Pei, L. & Evans, R. M. Nuclear receptors: decoding metabolic disease. *FEBS Lett.* **582**, 2–9 (2008).
214. Calkin, A. C. & Tontonoz, P. Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 213–224 (2012).
215. Kalaany, N. Y. & Mangelsdorf, D. J. LXRS and FXR: the yin and yang of cholesterol and fat metabolism. *Annu. Rev. Physiol.* **68**, 159–191 (2006).
216. Lee, F. Y., Lee, H., Hubbert, M. L., Edwards, P. A. & Zhang, Y. FXR, a multipurpose nuclear receptor. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 572–580 (2006).
217. Thomas, A. M. *et al.* Genome-wide tissue-specific farnesoid X receptor binding in mouse liver and intestine. *Hepatol. Baltim. Md* **51**, 1410–1419 (2010).
218. Chong, H. K. *et al.* Genome-wide interrogation of hepatic FXR reveals an asymmetric IR-1 motif and synergy with LRH-1. *Nucleic Acids Res.* **38**, 6007–6017 (2010).
219. Gronemeyer, H., Gustafsson, J.-A. & Laudet, V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 950–964 (2004).
220. Glass, C. K. & Saijo, K. Nuclear receptor transrepression pathways that regulate

- inflammation in macrophages and T cells. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 365–376 (2010).
221. Chiang, J. Y. L. Bile acids: regulation of synthesis. *J. Lipid Res.* **50**, 1955–1966 (2009).
222. Jones, S. Mini-review: endocrine actions of fibroblast growth factor 19. *Mol. Pharm.* **5**, 42–48 (2008).
223. Kir, S., Kliewer, S. A. & Mangelsdorf, D. J. Roles of FGF19 in liver metabolism. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **76**, 139–144 (2011).
224. Xie, M. H. *et al.* FGF-19, a novel fibroblast growth factor with unique specificity for FGFR4. *Cytokine* **11**, 729–735 (1999).
225. Hughes, S. E. Differential expression of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) multigene family in normal human adult tissues. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **45**, 1005–1019 (1997).
226. Inagaki, T. *et al.* Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab.* **2**, 217–225 (2005).
227. Holt, J. A. *et al.* Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes Dev.* **17**, 1581–1591 (2003).
228. Shapiro, H., Kolodziejczyk, A. A., Halstuch, D. & Elinav, E. Bile acids in glucose metabolism in health and disease. *J. Exp. Med.* (2018). doi:10.1084/jem.20171965
229. Wang, Y.-D., Chen, W.-D. & Huang, W. FXR, a target for different diseases. *Histol. Histopathol.* **23**, 621–627 (2008).
230. Izhar, L. *et al.* A Systematic Analysis of Factors Localized to Damaged Chromatin Reveals PARP-Dependent Recruitment of Transcription Factors. *Cell Rep.* **11**, 1486–1500 (2015).
231. Arumugam, M. *et al.* Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**, 174–180 (2011).
232. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* **486**, 207–214 (2012).
233. Langille, M. G. I. *et al.* Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat. Biotechnol.* **31**, 814–821 (2013).
234. Wostmann, B. S. Intestinal bile acids and cholesterol absorption in the germfree rat. *J. Nutr.* **103**, 982–990 (1973).
235. Claus, S. P. *et al.* Colonization-induced host-gut microbial metabolic interaction. *mBio* **2**, e00271-00210 (2011).
236. Ridlon, J. M., Kang, D.-J. & Hylemon, P. B. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J. Lipid Res.* **47**, 241–259 (2006).
237. Begley, M., Gahan, C. G. M. & Hill, C. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 625–651 (2005).
238. Wang, S. *et al.* The nuclear hormone receptor farnesoid X receptor (FXR) is activated by androsterone. *Endocrinology* **147**, 4025–4033 (2006).
239. Howard, W. R., Pospisil, J. A., Njolito, E. & Noonan, D. J. Catabolites of cholesterol synthesis pathways and forskolin as activators of the farnesoid X-activated nuclear receptor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **163**, 195–202 (2000).
240. Carter, B. A. *et al.* Stigmasterol, a soy lipid-derived phytosterol, is an antagonist of the bile acid nuclear receptor FXR. *Pediatr. Res.* **62**, 301–306 (2007).
241. Urizar, N. L. *et al.* A natural product that lowers cholesterol as an antagonist ligand for FXR. *Science* **296**, 1703–1706 (2002).
242. Pellicciari, R. *et al.* 6 $\alpha$ -ethyl-chenodeoxycholic acid (6-ECDCA), a potent and selective FXR agonist endowed with anticholestatic activity. *J. Med. Chem.* **45**, 3569–3572 (2002).

243. Maloney, P. R. *et al.* Identification of a chemical tool for the orphan nuclear receptor FXR. *J. Med. Chem.* **43**, 2971–2974 (2000).
244. Forman, B. M. *et al.* Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell* **81**, 687–693 (1995).
245. Reschly, E. J. *et al.* Evolution of the bile salt nuclear receptor FXR in vertebrates. *J. Lipid Res.* **49**, 1577–1587 (2008).
246. Mi, L.-Z. *et al.* Structural basis for bile acid binding and activation of the nuclear receptor FXR. *Mol. Cell* **11**, 1093–1100 (2003).
247. Porez, G., Prawitt, J., Gross, B. & Staels, B. Bile acid receptors as targets for the treatment of dyslipidemia and cardiovascular disease. *J. Lipid Res.* **53**, 1723–1737 (2012).
248. Protzer, U. Viral hepatitis: The bumpy road to animal models for HBV infection. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **14**, 327–328 (2017).
249. Yu, X. & Mertz, J. E. Differential regulation of the pre-C and pregenomic promoters of human hepatitis B virus by members of the nuclear receptor superfamily. *J. Virol.* **71**, 9366–9374 (1997).
250. Ramière, C. *et al.* Transactivation of the hepatitis B virus core promoter by the nuclear receptor FXR $\alpha$ . *J. Virol.* **82**, 10832–10840 (2008).
251. André, P., Ramière, C., Scholtes, C., Curtil, C. & Lotteau, V. Role of nuclear receptors in hepatitis B and C infections. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* **35**, 169–175 (2011).
252. Curtil, C. *et al.* The metabolic sensors FXR $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ , and SIRT1 cooperatively regulate hepatitis B virus transcription. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **28**, 1454–1463 (2014).
253. Reese, V. C., Moore, D. D. & McLachlan, A. Limited effects of bile acids and small heterodimer partner on hepatitis B virus biosynthesis in vivo. *J. Virol.* **86**, 2760–2768 (2012).
254. Yan, H. *et al.* Viral entry of hepatitis B and D viruses and bile salts transportation share common molecular determinants on sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *J. Virol.* **88**, 3273–3284 (2014).
255. Slijepcevic, D. *et al.* Impaired uptake of conjugated bile acids and hepatitis b virus pres1-binding in na(+) -taurocholate cotransporting polypeptide knockout mice. *Hepatol. Baltim. Md* **62**, 207–219 (2015).
256. Oehler, N. *et al.* Binding of hepatitis B virus to its cellular receptor alters the expression profile of genes of bile acid metabolism. *Hepatol. Baltim. Md* **60**, 1483–1493 (2014).
257. Kemper, J. K. *et al.* FXR acetylation is normally dynamically regulated by p300 and SIRT1 but constitutively elevated in metabolic disease states. *Cell Metab.* **10**, 392–404 (2009).
258. Belloni, L. *et al.* Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 19975–19979 (2009).
259. Shi, Y. *et al.* Resveratrol enhances HBV replication through activating Sirt1-PGC-1 $\alpha$ -PPAR $\alpha$  pathway. *Sci. Rep.* **6**, 24744 (2016).
260. Li, W.-Y. *et al.* The SIRT1 inhibitor, nicotinamide, inhibits hepatitis B virus replication in vitro and in vivo. *Arch. Virol.* **161**, 621–630 (2016).
261. Srisuttee, R. *et al.* Hepatitis B virus X (HBX) protein upregulates  $\beta$ -catenin in a human hepatic cell line by sequestering SIRT1 deacetylase. *Oncol. Rep.* **28**, 276–282 (2012).



262. Niu, Y. *et al.* Farnesoid X receptor ablation sensitizes mice to hepatitis b virus X protein-induced hepatocarcinogenesis. *Hepatology* **65**, 893–906 (2017).
263. Schulze, A., Mills, K., Weiss, T. S. & Urban, S. Hepatocyte polarization is essential for the productive entry of the hepatitis B virus. *Hepatology* **55**, 373–383 (2012).
264. Shimizu, Y., Nambu, S., Kojima, T. & Sasaki, H. Replication of hepatitis B virus in culture systems with adult human hepatocytes. *J. Med. Virol.* **20**, 313–327 (1986).
265. Gripon, P., Diot, C. & Guguen-Guillouzo, C. Reproducible high level infection of cultured adult human hepatocytes by hepatitis B virus: effect of polyethylene glycol on adsorption and penetration. *Virology* **192**, 534–540 (1993).
266. Gripon, P. *et al.* Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 15655–15660 (2002).
267. HepaRG - The most innovative and useful hepatic cell line. Available at: <https://www.heparg.com/>.
268. Bachour-El Azzi, P. *et al.* Comparative Localization and Functional Activity of the Main Hepatobiliary Transporters in HepaRG Cells and Primary Human Hepatocytes. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **145**, 157–168 (2015).
269. Ni, Y. *et al.* Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology* **146**, 1070–1083 (2014).
270. Samulski, R. J. & Muzyczka, N. AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes. *Annu. Rev. Virol.* **1**, 427–451 (2014).
271. Greig, J. A. *et al.* Non-Clinical Study Examining AAV8.TBG.hLDLR Vector-Associated Toxicity in Chow-Fed Wild-Type and LDLR+/-Rhesus Macaques. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* **28**, 39–50 (2017).
272. Greig, J. A. *et al.* Nonclinical Pharmacology/Toxicology Study of AAV8.TBG.mLDLR and AAV8.TBG.hLDLR in a Mouse Model of Homozygous Familial Hypercholesterolemia. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* **28**, 28–38 (2017).
273. Maguire, A. M. *et al.* Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N. Engl. J. Med.* **358**, 2240–2248 (2008).
274. Nathwani, A. C. *et al.* Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2357–2365 (2011).
275. Tratschin, J. D., West, M. H., Sandbank, T. & Carter, B. J. A human parvovirus, adeno-associated virus, as a eucaryotic vector: transient expression and encapsidation of the procaryotic gene for chloramphenicol acetyltransferase. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 2072–2081 (1984).
276. Hermonat, P. L. & Muzyczka, N. Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 6466–6470 (1984).
277. Cooper, M. *et al.* Improved induction of immune tolerance to factor IX by hepatic AAV-8 gene transfer. *Hum. Gene Ther.* **20**, 767–776 (2009).
278. Dion, S., Bourguine, M., Godon, O., Levillayer, F. & Michel, M.-L. Adeno-associated virus-mediated gene transfer leads to persistent hepatitis B virus replication in mice expressing HLA-A2 and HLA-DR1 molecules. *J. Virol.* **87**, 5554–5563 (2013).
279. Huang, L.-R. *et al.* Transfer of HBV genomes using low doses of adenovirus vectors leads to persistent infection in immune competent mice. *Gastroenterology* **142**, 1447–1450.e3 (2012).
280. Huang, Y.-H. *et al.* A murine model of hepatitis B-associated hepatocellular carcinoma generated by adeno-associated virus-mediated gene delivery. *Int. J. Oncol.* **39**,

1511–1519 (2011).

281. Chou, H.-H. *et al.* Age-related immune clearance of hepatitis B virus infection requires the establishment of gut microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 2175–2180 (2015).

282. Dandri, M., Lütgehetmann, M. & Petersen, J. Experimental models and therapeutic approaches for HBV. *Semin. Immunopathol.* **35**, 7–21 (2013).

283. Ellis, E. C. S. *et al.* Mice with chimeric livers are an improved model for human lipoprotein metabolism. *PloS One* **8**, e78550 (2013).

284. Naugler, W. E. *et al.* Fibroblast Growth Factor Signaling Controls Liver Size in Mice With Humanized Livers. *Gastroenterology* **149**, 728–740.e15 (2015).

285. Radreau, P. *et al.* Reciprocal regulation of farnesoid X receptor  $\alpha$  activity and hepatitis B virus replication in differentiated HepaRG cells and primary human hepatocytes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* (2016). doi:10.1096/fj.201500134

286. Nkongolo, S. *et al.* Cyclosporin A inhibits hepatitis B and hepatitis D virus entry by cyclophilin-independent interference with the NTCP receptor. *J. Hepatol.* **60**, 723–731 (2014).

287. Hantz, O. *et al.* Persistence of the hepatitis B virus covalently closed circular DNA in HepaRG human hepatocyte-like cells. *J. Gen. Virol.* **90**, 127–135 (2009).

288. Gibson, B. A. & Kraus, W. L. New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 411–424 (2012).

289. Wang, C. *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase 1 promotes oxidative-stress-induced liver cell death via suppressing farnesoid X receptor  $\alpha$ . *Mol. Cell. Biol.* **33**, 4492–4503 (2013).

290. Na, T.-Y. *et al.* Interaction of hepatitis B virus X protein with PARP1 results in inhibition of DNA repair in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **35**, 5435–5445 (2016).

291. Jung, D. & Kullak-Ublick, G. A. Hepatocyte nuclear factor 1 alpha: a key mediator of the effect of bile acids on gene expression. *Hepatol. Baltim. Md* **37**, 622–631 (2003).

292. Bhadra, O. D. *et al.* P0558: HBV infection is not affected by the induction of FXR activity but may limit the activity of FXR agonists in humanized mice. *J. Hepatol.* **62**, S524 (2015).

293. Lucifora, J. *et al.* Detection of the hepatitis B virus (HBV) covalently-closed-circular DNA (cccDNA) in mice transduced with a recombinant AAV-HBV vector. *Antiviral Res.* **145**, 14–19 (2017).

294. Theriot, C. M., Bowman, A. A. & Young, V. B. Antibiotic-Induced Alterations of the Gut Microbiota Alter Secondary Bile Acid Production and Allow for *Clostridium difficile* Spore Germination and Outgrowth in the Large Intestine. *mSphere* **1**, (2016).

295. Erken, R. *et al.* First clinical evaluation in Chronic Hepatitis B patients of the synthetic Farnesoid X Receptor agonist EYP001. in <http://www.enyopharma.com/wp-content/uploads/2018/04/Poster-EASL-International-Liver-Congress-2018-ENYO-Pharma.pdf>



# ANNEXES

## Présentations des travaux dans des congrès scientifiques

- B. Lacombe, **K. Mouzannar**, C. Ménard, V. Lotteau, C. Ramière and P. André. (Avril 2018). FXR is a proviral factor which binding to HBV genome is modulated by FXR agonist in an HBx dependent manner. The international liver congress 2018, EASL. Paris, France. (Poster)
- F. Fusil, C. Ménard, C. Ramière, A. Ollivier, **K. Mouzannar**, F.L. Cosset, V. Lotteau and P. André. (Avril 2018). FXR agonist GW4064 represses HBV replication in adult but not in young C3H/HeN mice after HBV transduction with rAAV2/8-HBV. The international liver congress 2018, EASL. Paris, France. (Poster)
- **K. Mouzannar**, C. Ramière, V. Lotteau and P. André (Avril 2017). An ealy step of Hepatitis B virus infection is dependent on the nuclear receptor for bile acids, farnesoid X receptor alpha. The international liver congress 2017, EASL. Amsterdam, Les Pays-Bas. (Poster)
- **K. Mouzannar**, C. Ramière, V. Lotteau and P. André (Mars 2017). An ealy step of Hepatitis B virus infection is dependent on the nuclear receptor for bile acids, farnesoid X receptor alpha. 17<sup>ème</sup> Réunion du réseau national des hépatites, ANRS. Paris, France (Oral)

# REMERCIEMENTS





