



**HAL**  
open science

# Interaction de la protéine Core du virus de l'Hépatite B avec les protéines de liaison aux ARN : effets sur la réplication virale et perspectives thérapeutiques

Hélène Chabrolles

## ► To cite this version:

Hélène Chabrolles. Interaction de la protéine Core du virus de l'Hépatite B avec les protéines de liaison aux ARN : effets sur la réplication virale et perspectives thérapeutiques. Virologie. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1321 . tel-02918179

**HAL Id: tel-02918179**

**<https://theses.hal.science/tel-02918179>**

Submitted on 20 Aug 2020

**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 :  
2018LYSE1321



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

**Ecole Doctorale n° 340**  
**Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire**

**Spécialité de doctorat** : Virologie  
**Discipline** : Infectiologie

Soutenue publiquement le 17/12/2018, par :  
**Hélène CHABROLLES**

---

**Interaction de la protéine Core  
du virus de l'Hépatite B  
avec les protéines de liaison aux ARN :  
effets sur la réplication virale et  
perspectives thérapeutiques**

---

Devant le jury composé de :

M. Pr. **Mathias FAURE**, PU, CIRI - Université Claude Bernard, Lyon      Président du jury

Mme Dr. **Christine NEUVEUT**, DR2 INSERM, Institut Pasteur, Paris      Rapporteur  
M. Dr. **Patrick SOUSSAN**, MCU-PH, CIMI, Paris      Rapporteur  
M. Pr. **Benoît CHABOT**, PU, Université de Sherbrooke      Examineur

Mme Dr. **SALVETTI, Anna**, DR2, CRCL      Directrice de thèse



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **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'Education  
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



# RESUME

## **Interaction de la protéine Core du virus de l'Hépatite B avec les protéines de liaison aux ARN : effets sur la réplication virale et perspectives thérapeutiques**

Plusieurs données expérimentales suggèrent que la protéine Core du virus de l'Hépatite B (HBV), en plus de ses fonctions structurales essentielles pour la formation des nucléocapsides dans le cytoplasme, pourrait avoir des fonctions régulatrices importantes dans le noyau des hépatocytes infectés. En effet, Core s'associe à l'ADNccc et aux promoteurs de certains gènes cellulaires dans le noyau des hépatocytes infectés et pourrait ainsi contrôler leur régulation transcriptionnelle. De plus, du fait de sa capacité à lier les ARN, elle pourrait également participer au métabolisme post-transcriptionnel de gènes viraux et/ou cellulaires. Pour caractériser ces fonctions, nous avons réalisé une analyse protéomique des facteurs cellulaires qui interagissent avec la protéine Core dans le noyau d'hépatocytes humains. Cette analyse a mis en évidence un grand nombre de protéines de liaison aux ARN (RBP) qui participent au métabolisme des ARN et, en particulier, aux mécanismes d'épissage. Deux facteurs interagissant avec Core, SRSF10 et RBMX, ont été plus particulièrement étudiés. Une analyse fonctionnelle effectuée grâce à l'utilisation de siRNA a montré que SRSF10 et RBMX ont des effets opposés sur les ARN viraux en agissant, vraisemblablement, à des étapes différentes du cycle viral. De même, un composé ciblant l'activité de certaines RBP diminue fortement la réplication d'HBV en affectant l'accumulation des ARN viraux.

Ces résultats suggèrent que l'une des fonctions nucléaires de Core consisterait à contrôler le destin des ARN viraux et/ou cellulaires en interagissant spécifiquement avec certaines RBP. Ils suggèrent également que ces interactions pourraient constituer une cible importante pour le développement de nouvelles stratégies antivirales.

**Mots Clés** : Virus de l'Hépatite B, Core, métabolisme des ARN, hépatocyte

# ABSTRACT

## **Interaction of the Hepatitis B virus Core protein with RNA binding proteins: effects on viral replication and therapeutic perspectives**

Converging evidences suggest that the Hepatitis B virus (HBV) core protein, beside its well-known structural role to form nucleocapsids in the cytoplasm, could have important regulatory functions in the nucleus of infected hepatocytes. Indeed, nuclear Core was shown to associate to viral and cellular DNA, suggesting that it may control their expression. In addition, Core has the capacity to bind RNA, and may thus regulate RNA metabolism. To elucidate these functions, we performed a proteomic analysis of the cellular factors interacting with Core in the nucleus of human hepatocytes. This analysis revealed a majority of highly interconnected RNA-binding proteins (RBPs) that participate in several steps of mRNA metabolism, including transcription, splicing and nuclear egress. We focused on two major Core-interacting factors, SRSF10 and RBMX that were previously involved in splicing and DNA repair. Functional analyses performed by a siRNA approach indicated that RBMX and SRSF10 were able to differentially regulate the level of viral RNAs most likely by acting at different steps of the viral life-cycle. Similarly, a small compound, affecting the activity of selected RBPs, severely impaired HBV replication by strongly reducing viral RNA accumulation. Altogether, these results strongly suggest that Core interacts with some selected RBPs to control the fate of viral and/or cellular RNAs and provide new critical information for the development of novel antiviral agents.

**Key words:** Core, RBP, RNA metabolism, Hepatitis B virus, hepatocyte

# SOMMAIRE

<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>1</b>
<b>ABREVIATIONS.....</b>	<b>5</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>9</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>13</b>
<b>I. Les protéines de liaison aux ARN ou RBP .....</b>	<b>18</b>
I.1. Les domaines de liaison à l'ARN des RBP .....	19
I.2. Les familles RBP .....	20
I.2.1. Les protéines SR .....	20
I.2.2. Les hnRNP .....	23
I.3. Les fonctions régulatrices canoniques des RBP .....	25
I.3.1. Régulation de la transcription .....	25
I.3.2. Régulation de l'épissage.....	27
I.3.3. Régulation de l'export nucléo-cytoplasmique des ARNm .....	35
I.3.4. Régulation de la stabilité des ARNm.....	36
I.3.5. Régulation de l'efficacité de traduction des ARNm .....	37
I.4. Localisation et régulation des RBP .....	39
I.4.1. RBP et compartiments cellulaires .....	39
I.4.2. Modifications post-traductionnelles des RBP .....	41
I.5. Fonctions des RBP dans la réparation de l'ADN .....	47
I.5.1. La réponse aux dommages à l'ADN et leur réparation .....	47
I.5.2. Action indirecte des RBP sur la réparation de l'ADN .....	50
I.5.3. Action directe des RBP sur la réparation de l'ADN .....	52
I.5.4. RBP et intégrité génomique .....	55
I.6. Identification de nouvelles RBP .....	57



I.7. RBP et Virus.....	59
I.6.1. Rôle des RBP dans le métabolisme des ARN viraux.....	60
I.6.2. Les protéines virales RBP-like .....	64
<b>II. Le Virus de l'Hépatite B.....</b>	<b>66</b>
II.1. Généralités .....	66
II.1.1. Prévalence et modes de transmission .....	66
II.1.2. Génotypes .....	67
II.1.4. Traitements.....	69
II.2. Classification et Structure d'HBV.....	72
II.2.1. Classification.....	72
II.2.2. Les particules virales et sub-virales .....	72
II.2.3. Structure du génome viral.....	74
II.2.4. Les transcrits d'HBV .....	76
II.2.5. Les protéines virales .....	77
II.3. Le cycle réplcatif d'HBV .....	82
II.3.1. Entrée et libération du génome viral .....	82
II.3.2. Formation de l'ADNccc .....	84
II.3.3. Transcription virale, encapsidation et reverse transcription .....	87
II.3.4. Devenir des capsides virales .....	88
II.4. HBV et métabolisme des ARN .....	89
II.4.1. Régulation de la transcription virale .....	89
II.4.2. ARN viraux et régulation post-transcriptionnelle .....	90
II.4.3. Traduction des ARNm viraux épissés et pathogenèse d'HBV .....	95
<b>OBJECTIFS DE RECHERCHE.....</b>	<b>98</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>99</b>
<b>I- Analyse protéomique des partenaires nucléaires d'HBc.....</b>	<b>99</b>
I.1. Identification des protéines associées à l'HBc nucléaire .....	99

I.2. Analyse des catégories fonctionnelles des partenaires de ST-HBc .....	103
I.3. Etudes de validation .....	107
I.3.1. Détection par Western blot des partenaires de ST-HBc dans les complexes purifiés .....	107
I.3.2. Interaction entre HBc et ses partenaires nucléaires.....	109
<b>II- Validations fonctionnelles : rôle des partenaires nucléaires d'HBc dans l'infection par HBV .....</b>	<b>112</b>
II.1. Speckles, Paraspeckles et infection par HBV.....	113
II.1.1. Etude de la localisation d'HBc, des Speckles et des Paraspeckles ...	113
II.1.2. Rôle des protéines des Speckles et Parapseckles dans l'établissement et la persistance de l'infection par HBV .....	116
II.3. SRSF10 et RBMX/TRA2 $\beta$ exercent des effets opposés sur l'infection par HBV .....	121
II.3.1. Effet de l'infection par HBV sur l'expression et la localisation de SRSF10, RBMX et TRA2 $\beta$ .....	122
II.3.2. Rôle de SRSF10, RBMX et TRA2 $\beta$ dans l'infection par HBV .....	127
II.4. Effet de SRSF10 et RBMX sur l'épissage des ARN d'HBV .....	137
II.4.1. Détection des ARN épissés et non épissés d'HBV dans les cellules dHepaRG.....	140
II.4.2. Rôle de SRSF10 et RBMX dans l'épissage d'HBV .....	141
<b>III- Impact de l'inhibition de la phosphorylation des protéines SR sur la réplication HBV .....</b>	<b>144</b>
III.1. Activité antivirale de JAD1 sur la réplication d'HBV.....	145
III.1.1. Effet de JAD1 sur la réplication d'HBV.....	145
III.1.2. Analyse de la réplication d'HBV après l'arrêt du traitement par JAD1 (effet rebond) .....	152
III.1.3. Effet de JAD1 sur l'épissage d'HBV.....	154
III.2. Effet de JAD1 sur l'établissement de l'infection par HBV .....	155
III.3. Effet conjoint de JAD1 et SRSF10 sur la réplication d'HBV .....	158

<b>DISCUSSION .....</b>	<b>161</b>
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>174</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>185</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>224</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>227</b>
<b>Annexe 1 : Essai en double hybride de levure .....</b>	<b>227</b>
<b>Annexe 2 : Brevet.....</b>	<b>232</b>
<b>Annexe 3 : Revue Médecine/Sciences .....</b>	<b>234</b>

# ABREVIATIONS

AA	Acides Aminés
AAV	Virus Adéno-Associé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNccc	ADN circulaire clos de façon covalente
ADNrc	AND relâché circulaire
ADNv	ADN viral
ADP ribose	Adénosine diphosphate ribose
AdV	AdénoVirus
ARE	AU rich element
ARN	Acide ribonucléique
ARNdb	ARN double brin
ARNi	ARN interférant
ARNlnc	ARN long non codant
ARNm	ARN messenger
ARN-Pol	ARN polymérase II
ARNpg	ARN pré-génomique
ARNpré-m	ARN pré-messenger
AS-PCR	Alternative splicing PCR
ATM	Ataxia -telangiectasia-mutated protein
ATR	Ataxia Telangiectasia mutated and Rad3-related protein
BCLAF1	Facteur de transcription 1 associé à bcl-2
BER	Réparation par excision de base
bp	Paire de bases
BRCA2	Breast Cancer susceptibility protein 2
CAM	Modulateurs allostériques de Core
Cdk	Cyclin dependant kinase
CGRP	Calcitonin gene related peptide
CHC	Carcinome hépatocellulaire
CHEK1/CHEK2	Checkpoint Kinase 1 / 2
CK2	Casein Kinase 2
CLK	CDC-like kinase

CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CTD	Domaine C terminal
CTE	Constitutive transport element
DDS	DNA damage site
DDR	DNA damage response
DDS	DNA damage site
DHBV	Duck Hepatits B Virus
dHepaRG	HepaRG différenciées
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNA-PK	DNA-dependant Protein Kinase
dNTP	Désoxynucléotide triphosphate
DRP	DNA repair protein
DSB	Double strand break
dsRBM	double stranded RNA Binding Motif
EBV	Epstein Barr Virus
Enh	Enhancer
ESE	Exon Splicing Enhancer
ESS	Exon Splicing Silencer
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase
GnRH	Gonadotrophin-releasing Hormone
H2AX	variante X de la famille des histones H2A
$\gamma$ H2AX	H2AX phosphorylé sur Ser-140
HAT	Histones Acetyl Transferase
HBDSF	Hepatitis B Doubly Spliced Protein
HBeAg	HBe antigene
HBsAg	HBs antigene
HBV	Virus de l'Hépatite B
HIV	Human Immunodeficiency Virus
hnRNP	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein
HPV	Human Papillomavirus
HR	Homologous Recombinaison
HSPG	Heparan Sulfate ProteoGlycans
HSV-1	Herpès Simplex Virus
kDa	Kilo Dalton

IGC	Interchromatin Granule Clusters
IF	Immunofluorescence
IFN	Interféron
IP	Immunoprécipitation
ISE	Intron Splicing Enhancer
ISG	Interferon-Stimulated Gene
ISS	Intron Splicing Silencer
KH	K Homology
KSHV	Kaposi's Sarcoma-associated HerpesVirus
MMR	Mismatch Repair
MPMV	Mason Pfizer Monkey Virus
MRN	MRE11/RAD50/NBS1 Complex
MVB	Multi Vesicular Bodies
NER	Nucleotide Excision Repair
NHEJ	Non-Homologous End Joining
NMD	Non-sens mediated decay
NTD	Domaine N terminal
NPC	Nuclear pore complex
NS	Nucleo-cytoplasmic shuttling
PABP-C	Cytoplasmic poly(A)-binding protein
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PARP	Poly (ADP-Ribose) Polymerase
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PDIP38	Polymerase delta interacting protein 38
PF	Perichromatin Fibrils
PHH	Hépatocytes primaires humains
PIAS1	Protein Inhibitor of activated STAT-1
PLA	Proximity Ligation Assay
PML	Promyelocytic leukemia protein
PRE	Posttranscriptional Regulatory Element
PRR	Pathogen Recognition Receptor
PSF	PTB-associated Splicing Factor
PSI	Percent Splicing Index
PSPC1	ParaSpeckles Protein1

P-TEF	Positive Transcription Elongation Factor
PTB-BS	PTB-Binding Site
PTC	Codon de Terminaison Prématuré
PTM	Modification post-traductionnelle
qPCR	PCR quantitative ou PCR en temps réel
RBD	RNA-Binding Domain
RBMX	RNA binding motif protein X
RBP	Protéines de liaison aux ARN
RNP	Ribonucléoprotéine
RRM	RNA Recognition Motif
rt-qPCR	PCR quantitative ou PCR en temps réel
SG	Granules de stress
siRNA	small interfering RNA
SMN	Survival MotoNeuron
snRNA	small nuclear RNA
SP1	Splicing product 1
SR	Serine/Arginine Rich
SRE	Splicing Regulatory Element
SRPK	SR-specific protein kinase
SRSF	Serine/arginine rich splicing factor
SSB	Single strand break
SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier
SVP	Particules sub-virales
TA	Température ambiante
TDF	Ténofovir disoproxil fumarate
TERT	Téломérase réverse transcriptase
TRA2	Transformer 2 protein homolog
UTR	Untranslated Transcribed Region
Vhs	Viral host shut-off protein
WHBV	Woodchuck Hepatits B Virus
ZnF	Zinc Finger

# LISTE DES FIGURES

Figure 1. Défenses de l'hôte contre les pathogènes infectieux.....	13
Figure 2. La réponse antivirale intrinsèque.....	15
Figure 3. Les étapes du métabolisme des ARN. ....	18
Figure 4. Représentation structurale des protéines SR et apparentées. ....	22
Figure 5. Structure des protéines hnRNP.....	24
Figure 6. Rôle des protéines SR et hnRNP dans le métabolisme des ARNm. ....	26
Figure 7. L'épissage des ARNpré-m.....	29
Figure 8. Effet différentiel de SRSF10 sur l'épissage alternatif.....	32
Figure 9. Le rôle des kinases dans la localisation des protéines SR.....	44
Figure 10. La réponse aux dommages à l'ADN.....	49
Figure 11. Les rôles non canoniques des RBP et des DRP. ....	53
Figure 12. Eléments <i>cis</i> -régulateurs et épissage d'HIV-1.....	61
Figure 13. Séroprévalence mondiale de l'hépatite B. ....	66
Figure 14. Distribution géographique des différents géotypes d'HBV.....	67
Figure 15. Particule infectieuse d'HBV et éléments sécrétés. ....	73
Figure 16. Structure du génome d'HBV.....	75
Figure 17. Les protéines virales.....	78
Figure 18. Cycle réplcatif d'HBV. ....	84
Figure 19. Conversion de l'ADNrc en ADNccc. ....	85
Figure 20. Maturation de la capsid e d'HBV et recyclage. ....	88
Figure 21. Les transcrits non épissés d'HBV et les protéines correspondantes. ....	91
Figure 22. L'élément <i>cis</i> -régulateur PRE des transcrits d'HBV.....	91
Figure 23. Les transcrits épissés d'HBV, les sites d'épissage et les protéines issues de l'épissage.....	94
Figure 24. Caractérisation de la lignée HepaRG-TR-ST-HBc.....	99
Figure 25. Purification des complexes protéiques associés à ST-HBc.....	101
Figure 26. Analyse statistique et bioinformatique des partenaires de ST-HBc. ....	102
Figure 27. Analyse bioinformatique des partenaires nucléaires d'HBc.....	103
Figure 28. Réseaux d'interaction entre les 11 protéines « initiatrices » impliquées dans l'épissage des ARNm <i>via</i> le spliceosome, et l'ensemble des protéines identifiées dans le protéome d'HBc. ....	105



Figure 29. Enrichissement et stœchiométrie des 11 protéines « initiatrices » dans les complexes associés à ST-HBc.....	106
Figure 30. Détection par Western blot des partenaires de ST-HBc dans les extraits purifiés.....	108
Figure 31. Co-immunoprécipitation de SRSF10 et RBMX avec un anticorps anti-HBc. ....	110
Figure 32. Interactome des protéines des Paraspeckles.....	112
Figure 33. Localisation d'HBc par rapport aux Speckles dans les PHH infectés par HBV. ....	114
Figure 34. Localisation d'HBc par rapport aux protéines des Paraspeckles.....	115
Figure 35. Protocole de transfection des siRNA avant l'infection. ....	117
Figure 36. Effet de l'inhibition de SRSF1 sur l'établissement et la persistance d'HBV. ....	118
Figure 37. Effet de l'inhibition de FUS, RBM14 et NONO sur l'établissement et la persistance d'HBV. ....	120
Figure 38. Modèle hypothétique d'interaction entre SRSF10, RBMX et TRA2B.....	121
Figure 39. Expression de SRSF10, RBMX et TRA2 $\beta$ au cours de l'infection par HBV. ....	122
Figure 40. Localisation de HBc et de SRSF10 durant l'infection par HBV.....	124
Figure 41. Localisation de HBc et de RBMX durant l'infection par HBV.....	125
Figure 42. Localisation de HBc et de TRA2 $\beta$ durant l'infection par HBV. ....	126
Figure 43. Protocoles de transfection des siRNA. ....	127
Figure 44. Effet des siRNA sur l'expression des protéines cibles et du récepteur NTCP, des transfections réalisées avant l'infection par HBV. ....	128
Figure 45. Effet des siRNA sur l'expression des protéines cibles lors des transfections réalisées après infection par HBV. ....	129
Figure 46. Analyses de toxicité de la transfection par les siRNA SRSF10, RBMX et TRA2 $\beta$ . ....	129
Figure 47. Effet de l'inactivation de SRSF10 sur l'établissement et la persistance d'HBV. ....	130
Figure 48. Effet de l'inactivation de RBMX sur l'établissement et la persistance d'HBV. ....	131
Figure 49. Effet de l'inactivation de SRSF10 ou RBMX sur la réplication d'HBV....	132

Figure 50. Effet de l'inactivation de RBMX et/ou de l'activité de PARP1 sur l'établissement de l'infection par HBV. ....	134
Figure 51. Effet de l'inactivation de TRA2B sur la réplication d'HBV. ....	136
Figure 52. Analyse de l'épissage des transcrits d'HBV par AS-PCR (Alternative splicing analysis by end-point RT-PCR). ....	138
Figure 53. Amorces permettant la quantification de chaque transcrit d'HBV par RT-qPCR. ....	139
Figure 54 : Epissage des ARN d'HBV dans les dHepaRG au cours de l'infection..	140
Figure 55 : Epissage des ARN d'HBV lors de l'inhibition de SRSF10 et RBMX avant l'infection.....	142
Figure 56. Structure et mode d'action de la molécule 1C8 (JAD01). ....	144
Figure 57. Effet de JAD1 sur la réplication d'HBV (genotype D) dans des cellules dHepaRG.....	146
Figure 58. Toxicité et EC50 de JAD1. ....	147
Figure 59 : Effet de JAD1 sur la réplication d'HBV (genotype D) dans des PHH....	148
Figure 60 : Effet de JAD1 sur la réplication d'HBV (genotype C) dans des cellules HepaRG.....	150
Figure 61. Effet de JAD1 sur la réplication d'HBV (genotypes A, B, C, E, G, H). ...	151
Figure 62 : Effet de l'arrêt du traitement de JAD1 sur la reprise de la réplication d'HBV (genotype D) dans les cellules dHepaRG.....	153
Figure 63. Effet de JAD1 sur l'épissage d'HBV.....	154
Figure 64. Effet de 1C8 sur l'établissement de l'infection HBV dans des cellules HepaRG (Génotype D). ....	156
Figure 65. Effet de 1C8 sur l'établissement de l'infection HBV dans des cellules HepaRG (Génotype C). ....	157
Figure 66. Effet de JAD1 sur la réplication d'HBV en présence ou non de SRSF10. ....	159
Figure 67. Modèle hypothétique d'interaction entre Core et les facteurs cellulaires SRSF10, RBMX et TRA2 $\beta$ . ....	164
Figure 68. Effets des facteurs SRSF10, RBMX et TRA2B sur le cycle infectieux d'HBV déduits des expériences de transfection de siRNA. ....	165
Figure 69. Effet différentiel de JAD1 comparé aux NUC et aux CAM.....	172
Figure 70 : Modèle hypothétique des effets de Core et/ou HBV sur l'activité des RBP .....	173

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Liste des protéines SR et leur nom de gène correspondant.....	21
Tableau 2. Effet de la déplétion de SRSF10, RBMX ou TRA2 $\beta$ sur les paramètres viraux, avant ou après l'infection par HBV.....	164
Tableau 3. Liste anticorps primaires utilisés en Western blot.....	178
Tableau 4. Liste anticorps primaires utilisés pour en immunofluorescence.....	179
Tableau 5. Liste des siRNA cibles leur référence.....	180
Tableau 6. Couples d'amorces pour la (RT)-qPCR conventionnelle.....	182
Tableau 7. Couples d'amorces pour la (RT)-qPCR TaqMan.....	183
Tableau 8. Couples d'amorces pour la RT-qPCR des transcrits épissés ou non d'HBV.....	184
Tableau 9. Couples d'amorces pour l'AS-PCR des transcrits d'HBV.....	184

# INTRODUCTION

L'organisme humain possède de nombreuses barrières de protection contre les agents pathogènes infectieux, tels que les virus (Figure 1). L'immunité intrinsèque constitue le premier obstacle que doivent affronter les virus après avoir franchi les barrières physiques et chimiques de l'organisme. Elle se compose d'éléments intracellulaires toujours présents, même en l'absence d'infection, qui constituent des facteurs de restriction spécifiques (protéines, ARN). Cette réponse est donc immédiate. Puis, les effecteurs de l'immunité innée induits par l'infection dressent un deuxième obstacle qui va permettre de contenir ultérieurement les pathogènes voire de les détruire. Cette réponse est mise en jeu très rapidement, dans un délai de quelques heures après l'entrée de l'agent pathogène dans l'organisme. Enfin, les agents infectieux les plus agressifs qui auront franchi ces obstacles, devront faire face à l'immunité adaptative qui est façonnée spécifiquement, dans un délai de plusieurs jours (1) (Figure 1). La réponse antivirale intrinsèque constitue donc la première ligne des défenses contre les virus et cela grâce à des facteurs de restriction cellulaires constitutifs qui forment un environnement défavorable à la réplication virale (2). Cette réponse est primordiale pour, si ce n'est éliminer le virus, au moins le contenir afin de laisser le temps aux immunités innée et adaptative de se mettre en place.

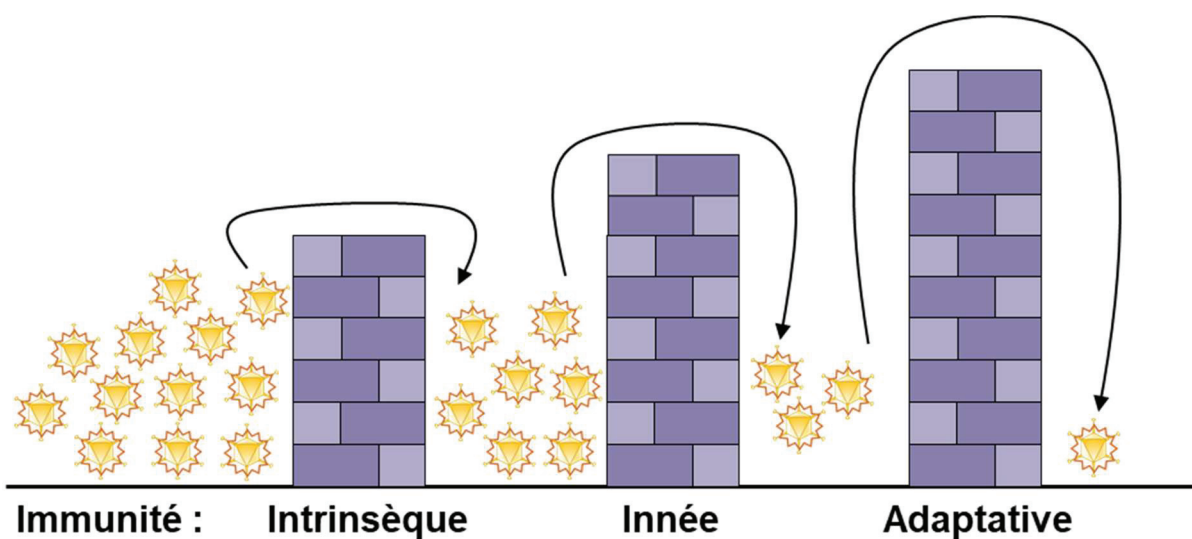


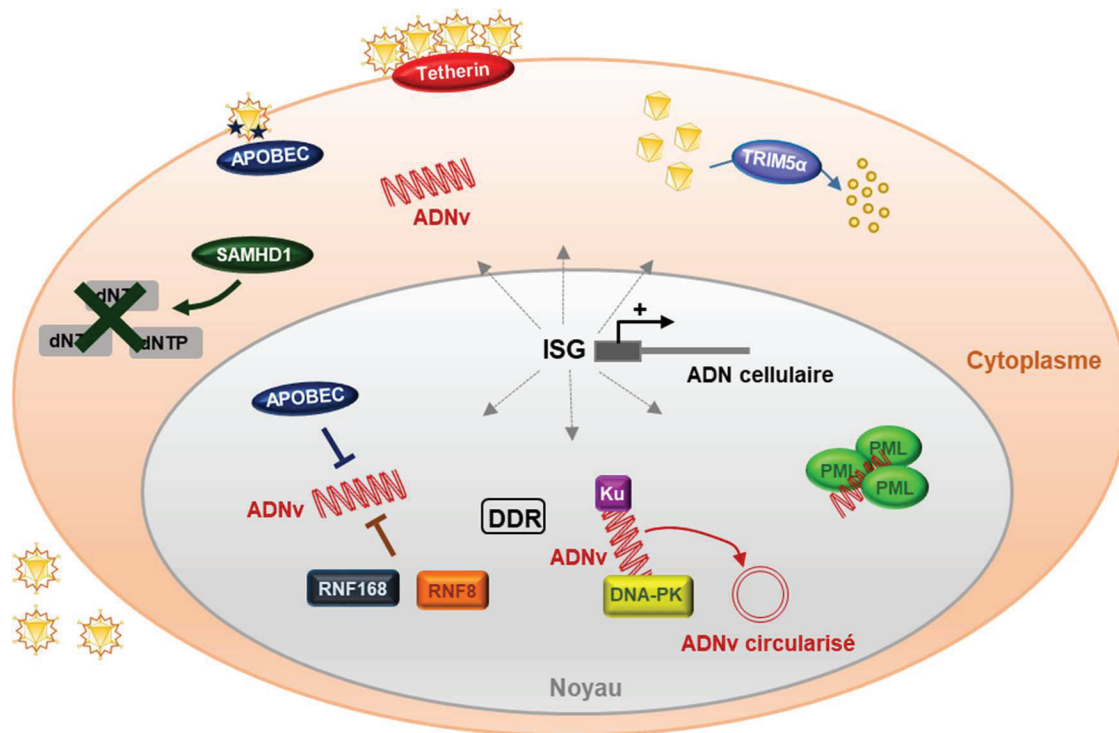
Figure 1. Défenses de l'hôte contre les pathogènes infectieux.

Une des réponses antivirales les plus précoces et les plus conservées est composée par des ARN interférants (ARNi). Chez les bactéries, le système CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) permet de dégrader les ADN étrangers de manière séquence-spécifique. Chez les eucaryotes, le système Dicer est impliqué dans le clivage des longs ARN double brins (ARNdb) exogènes, notamment générés lors de la réplication des virus à ADN. Chez les vertébrés, en particulier les mammifères, les virus déclenchent plutôt une immunité liée aux protéines présentes de façon constitutive ou de façon induite par l'IFN (Interféron) (2,3).

- **Facteurs de restriction antivirale spécifiques**

Dans les cellules humaines, des protéines appelées facteurs de restriction exercent une action antivirale directe. Les protéines de la famille APOBEC3 ont une activité déaminase permettant à APOBEC3B de déstabiliser le génome viral lors de la réplication d'HBV (Virus de l'Hépatite B) (4), ou à APOBEC3G d'induire des mutations du génome du HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus 1) (5). Lors de l'infection par HIV-1, TRIM5 $\alpha$  a une action antivirale en induisant une désagrégation précoce de la capsid dans le cytoplasme (6) ; la Tetherine présente à la surface des cellules cibles et des enveloppes virales, entraîne leur agrégation à la surface des cellules pour limiter la propagation virale (7) ; SAMHD1 hydrolyse les dNTP et réduit donc leur disponibilité pour la réplication virale (8). Tous ces facteurs sont aussi des ISG (Interferon-Stimulated Gene), leur expression peut donc être induite ultérieurement par la réponse immunitaire innée (Figure 2). Cependant, la plupart des virus ont mis en place des stratégies pour contrer ces facteurs de la réponse cellulaire intrinsèque, à l'aide de leurs protéines virales (Vif contre APOBEC3G, Vpx contre SAMHD1...) (9,10).

Certains compartiments nucléaires tels que les corps PML qui se caractérisent par la présence de la protéine PML (Promyelocytic leukemia protein), sont associés à la réponse intrinsèque. En effet, ils réguleraient de façon négative la réplication des virus à ADN et ARN en inhibant leur transcription, la protéine PML ayant plusieurs isoformes avec chacune une cible virale préférentielle (PML I et II pour dans le cas du virus de l'Herpès Simplex Virus 1 ou HSV-1). De plus, certaines protéines virales peuvent être relocalisées dans les corps PML pour être dégradées. La réponse à l'IFN contribue dans un second temps à augmenter l'expression des protéines des corps



**Figure 2. La réponse antivirale intrinsèque.**

De nombreuses protéines cellulaires participent à la réponse antivirale intrinsèque : les protéines de la famille APOBEC déstabilisent le génome viral (ADNv) par leur activité désaminase, TRIM5α désagrège les capsides virales, la Tetherine agrège les virus à la surface des cellules, SAMHD1 hydrolyse les dNTP nécessaires à la synthèse d'acides nucléiques viraux. Les corps nucléaires comme les PML inhibent la réplication virale. Les DRP (DNA repair protein) comme la DNA-PK et les protéines Ku inactivent le génome viral en le circularisant ; RNF8 et RNF168 recrutent les effecteurs de la réparation de l'ADN ce qui inhibe la réplication virale. Les gènes codant pour ces facteurs sont aussi des ISG (Interferon-Stimulated Genes).

PML. Mais, les virus ont mis en place des stratégies afin de contrer l'action antivirale des corps PML : c'est le cas du virus HSV-1 qui code pour une ubiquitine ligase, la protéine ICP0 exprimée précocement après l'entrée du virus et qui dégrade spécifiquement les protéines PML (11,12), mais aussi de l'AdV (adénovirus) qui, grâce à la protéine virale E4ORF3, induit une désagrégation des corps PML et de leurs composants (13).

- **Facteurs de réparation de l'ADN et réponse intrinsèque antivirale**

Les facteurs impliqués dans la détection et la réparation des dommages à l'ADN (DRP pour « DNA repair protein ») participent aussi de façon importante à la réponse intrinsèque. Par exemple, la kinase DNA-PK (DNA-dependent Protein Kinase) qui est une enzyme clef de régulation de la voie de réparation de l'ADN par NHEJ (Non-

Homologous End-Joining), agit avec les protéines Ku (protéines stabilisatrices de la DNA-PK sur les extrémités ADN endommagées) pour circulariser le génome d'HSV-1 et ainsi empêcher sa réplication. Les E3 ubiquitines ligases RNF8 et RNF168, ubiquitinent les histones pour recruter les effecteurs de la DDR (DNA damage response) tels que 53BP1 ou BRCA1 sur les sites de dommages, et lors de l'infection par HSV-1, elles inhibent la réplication du virus. Comme dans le cas des protéines PML, l'action antivirale de ces facteurs est contrecarrée par l'expression de la protéine virale ICP0 qui induit leur dégradation (14,15).

- **Métabolisme des ARN et réponse intrinsèque anti-virale**

Les facteurs impliqués dans le métabolisme des ARN cellulaires (les protéines de liaison aux ARN ou RBP pour RNA-Binding Proteins) participent aussi à la réponse intrinsèque à l'infection virale. Dans les cellules humaines, la machinerie du métabolisme des ARN est adaptée à ses 97% d'ARNm qui possèdent des introns et sont épissés (16). Les facteurs cellulaires d'épissage et d'export des ARN peuvent représenter un obstacle à la réplication des virus quand la majorité de leurs ARNm ne contient pas d'intron, comme c'est le cas pour HSV-1. Ce virus doit donc détourner la machinerie d'export adaptée aux ARNm épissés afin de permettre l'export de ses propres ARNm non épissés. Dans le cas d'HIV-1, certains des ARNm viraux nécessitent un épissage et d'autres pas, le virus doit donc finement réguler l'activité des RBP cellulaires, car un épissage excessif est délétère à sa réplication (17).

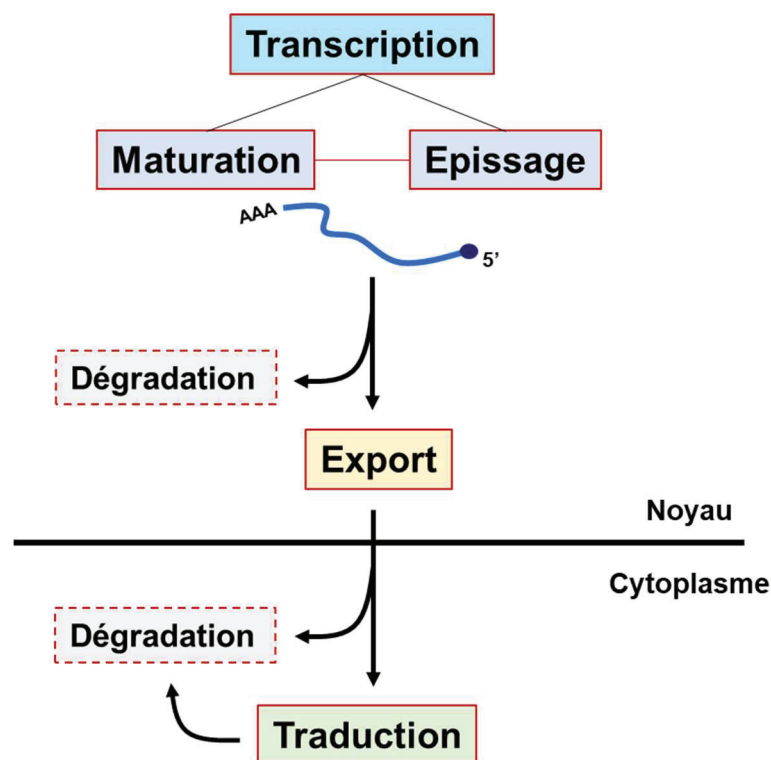
Des corps nucléaires formés par des RBP assemblées sur un long ARN non codant (ARNInc), les Paraspeckles, ont un rôle encore mal connu mais semblent impliqués dans la rétention d'ARNm et de protéines. Cette rétention se ferait soit dans un but de dégradation, soit de stockage en vue d'un relargage rapide en cas de stress, comme lors d'une infection virale (18,19). De façon intéressante, certaines RBP présentes dans les Paraspeckles, sont aussi impliquées dans la DDR (20), voie déjà citée comme actrice de la réponse antivirale intrinsèque. Ces structures pourraient donc entrer en jeu dans la réponse intrinsèque aux infections virales, en libérant des RBP ou des DRP ayant une action antivirale. Il convient de noter que, comme nous les verrons par la suite, les fonctions des RBP et des DRP apparaissent de plus en plus interconnectées et la frontière entre ces deux classes de protéines de plus en plus difficile à définir.

Les RBP ont ainsi une activité antivirale intrinsèque et interviennent aussi dans la réponse immunitaire innée qui dépend du bon contrôle de l'expression des gènes qu'elle met en jeu. Souvent, les virus codent pour des protéines qui leur permettent de contrer ces réponses antivirales ou de les détourner à leur profit. Ainsi, dans le cadre de l'infection par HBV, une meilleure compréhension des rôles des RBP pourrait permettre de préciser les mécanismes d'établissement et de persistance de l'infection, ainsi que l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques cellulaires pour améliorer la prise en charge des malades.



## I. Les protéines de liaison aux ARN ou RBP

Les protéines de liaison aux ARN possèdent une structure particulière, avec des régions qui leur permettent de se lier aux ARN, et d'autres qui leur confèrent leur activité catalytique. Le métabolisme des ARN comprend plusieurs étapes : la transcription, la maturation, l'épissage, l'export nucléo-cytoplasmique, la traduction, et enfin la stabilité des ARNm (Figure 3). Les RBP sont très connues pour leur rôle de facteurs d'épissage, mais elles participent aussi à toutes les autres étapes du métabolisme des ARN. Afin de réguler leurs activités, elles subissent des modifications post-traductionnelles (PTM). Dans ce chapitre, nous nous concentrerons sur les deux familles de RBP les plus décrites, les protéines SR et les hnRNP.



**Figure 3. Les étapes du métabolisme des ARN.**

Les ARNm sont synthétisés lors de l'étape de transcription, ils sont maturés (coiffe en 5', polyadénylation) et épissés, puis exportés vers le cytoplasme pour être traduits en protéines. Les ARN qui présentent des anomalies sont dégradés.

## I.1. Les domaines de liaison à l'ARN des RBP

Les RBP comportent des domaines de liaison aux ARN (RBD pour RNA-Binding Domain) nécessaires à leur recrutement sur les ARNm. Il existe quatre types de RBD majeurs : les domaines **RRM** (RNA Recognition Motif) ou motif de reconnaissance des ARN, **ZnF** (Zinc Finger) ou structure en doigt de Zinc, **KH** (K Homology) ou domaine homologue à l'hnRNPk, et **dsRBM** (double stranded RNA Binding Motif) ou motif de liaison à l'ARN double brin. Généralement, les RBP contiennent plusieurs types de domaines de liaison aux ARN, qui leur confèrent la capacité à se fixer aux ARN de façon spécifique et avec une forte affinité.

Le **domaine RRM** a été le premier décrit et il est le plus fréquent chez les RBP humaines (21,22). Il se compose de 80 à 90 acides aminés (AA) qui forment quatre feuillets  $\beta$  et deux hélices  $\alpha$  (topologie  $\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$ ). La liaison aux ARN se fait par les feuillets  $\beta$  grâce aux motifs conservés de résidus aromatiques RNP1 et RNP2 (Ribonucléoprotéines 1 et 2). Un RRM reconnaît généralement 4 à 8 nucléotides et la spécificité de liaison à l'ARN est augmentée par sa présence en plusieurs copies (23). L'absence de ces résidus aromatiques donne lieu à des sous classes de RRM, les RRM homologues comme les quasi-RRM (24). Les extrémités N et C terminales des RRM sont aussi importantes puisqu'elles peuvent interagir avec l'ARN cible et participent à une reconnaissance spécifique. Par exemple, les extrémités de TRA2 $\beta$  (Transformer 2 protein homolog  $\beta$ ) sont mises en jeu lors de l'interaction avec l'ARN cible et seraient importantes pour le recrutement de deux autres protéines, RBMX/hnRNP-G (RNA binding motif protein X) et SRp30c, nécessaires à l'activité de TRA2 $\beta$  pour l'activation de l'épissage de l'exon 7 du transcrit codant pour la protéine SMN (Survival MotoNeuron) (25,26).

Le **domaine ZnF** compte 20 à 30 AA et permet une fixation aussi bien à l'ARN qu'à l'ADN. Il contient dans sa « poche » un ion zinc ou un autre ion métallique qui interagit avec des résidus cystéine et histidine (ZnF-CCHH ou ZnF-CCCH en fonction de leur nombre) (27). Le premier type de domaine (CCHH) se lie à l'ADN mais aussi à l'ARN, alors que le second (CCCH) se fixe spécifiquement aux séquences UAUU des éléments riches en AU (ARE) des ARN (28). Ce mode de reconnaissance est aussi utilisé par un troisième type de domaine ZnF, le ZnF-CCHC, retrouvé notamment dans la protéine de capsid de d'HIV-1 et qui est crucial pour la réplication de ce virus (29).

Le **domaine KH** a été identifié dans la protéine qui lui a donné son nom, hnRNP-K. Il lie les molécules d'ADN et d'ARN simple brin (30) grâce à environ 70 AA avec au centre une signature fonctionnelle spécifique. Les domaines KH comptent trois feuillets  $\beta$  et trois hélices  $\alpha$  qui forment plusieurs types de topologie :  $\beta\alpha\beta\beta\alpha$  (type I),  $\alpha\beta\beta\alpha\beta$  (type II). Ces structures permettent la formation d'une boucle qui reconnaît quatre nucléotides au niveau des ARN (31,32).

Le **domaine dsRBM** (double stranded RNA Binding Motif) est composé de 70 à 90 AA avec une topologie conservée  $\alpha\beta\beta\beta\alpha$ , et se lie aux ARN double brin. Contrairement aux trois domaines précédents, celui-ci n'interagit pas avec les ARN de façon séquence-spécifique, mais plutôt structure-spécifique en interagissant avec les extrémités 3'OH et les phosphates des ARN (33).

Les études *in silico* de recherche des motifs de liaison à l'ARN à l'échelle du génome humain ont mis en évidence un large éventail de RBP. Avec 487 occurrences, le RRM est le plus représenté, suivi par le ZnF (167 fois) et le domaine KH (95 fois). A eux seuls, ils sont présents dans près de 4% des protéines humaines (34). Ces motifs permettent des interactions hautement variées et spécifiques grâce à leur répétition et à leur combinaison. En plus de leur rôle dans l'assemblage des complexes ribonucléoprotéiques, les RBD régulent aussi l'activité de ces complexes du fait de leurs interactions avec d'autres protéines, grâce à des motifs protéiques particuliers.

## I.2. Les familles RBP

### I.2.1. Les protéines SR

Les protéines SR (Serine/Arginine Rich factors) se caractérisent par un domaine riche en arginines et en sérines (domaine RS) et sont les facteurs d'épissage qui ont été les plus étudiés. Un grand nombre de protéines SR ont été identifiées comme facteurs associés au spliceosome, le complexe multiprotéique associé aux étapes d'épissage (35,36). Les deux protéines fondatrices de cette famille, SRSF1 (ASF/SF2) et SRSF2 (SC35) ont permis la description de la structure conservée de cette famille (37).

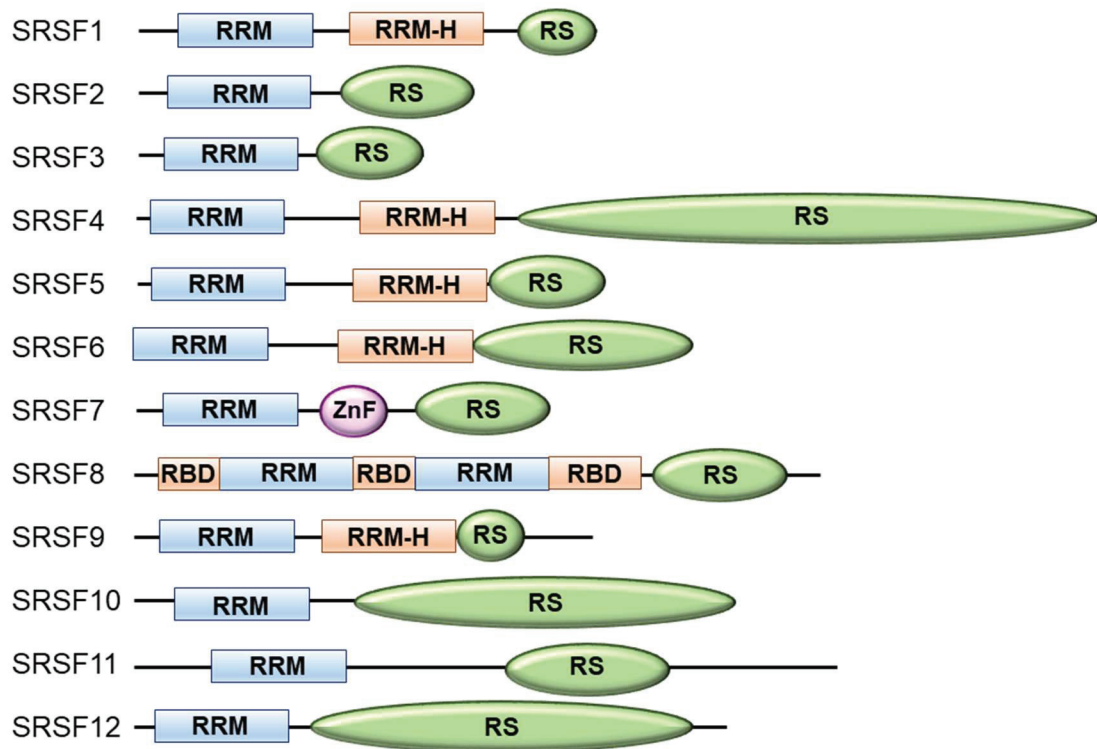
La structure des protéines SR est définie par un ou deux domaines de liaison à l'ARN en N terminal, qui sont presque exclusivement de type RRM. En C terminal, les protéines SR possèdent un domaine RS de plus de 50 AA comptant plus de 40% de sérines (S) et d'arginines (R) et caractérisées par des répétitions SR ou RS, pouvant être poly-phosphorylés (Figure 4). Cette famille compte 12 membres, de SRSF1 à SRSF12 (38) (Tableau 1). Les protéines SR ont donc la capacité de se lier à l'ARN *via* leur RBD, ainsi qu'à d'autres RBP *via* leur domaine RS, ce qui leur confère leur rôle dans l'épissage, mais aussi dans d'autres étapes du métabolisme des ARN comme l'export ou la stabilité (39).

Gène (ancienne nomenclature)	Autres noms	Gène (nouvelle nomenclature)
SFRS1	ASF, SF2, SRp30a	SRSF1
SFRS2	SC35, PR264, SRp30b	SRSF2
SFRS3	SRp20	SRSF3
SFRS4	SRp75	SRSF4
SFRS5	SRp40, HRS	SRSF5
SFRS6	SRp55, B52	SRSF6
SFRS7	9G8	SRSF7
SFRS2B	SRp46 (humaine)	SRSF8
SFRS9	SRp30c	SRSF9
SFRS13A	TASR1, SRp38, SRrp40	SRSF10
SFRS11	P54, SRp54	SRSF11
SFRS13B	SRp35	SRSF12

**Tableau 1. Liste des protéines SR et leur nom de gène correspondant.**

On compte des protéines additionnelles aux protéines SR. Leur structure n'est pas aussi conservée que celle des protéines SR classiques mais est cependant très proche. Avec un ou plusieurs domaines RS et un RRM-like (Figure 4), elles ont une activité démontrée dans l'épissage des ARNm, comparable à celle des protéines SR proprement dites. Parmi ces protéines additionnelles, on trouve notamment TRA2 $\alpha$  et TRA2 $\beta$ , qui participent à l'activation de l'épissage en se fixant préférentiellement aux séquences riches en GAA fréquemment retrouvées dans les motifs favorisant l'épissage (40).

## Les protéines SR



## Les protéines SR additionnelles



**Figure 4. Représentation structurale des protéines SR et apparentées.**

Les protéines SR présentent toutes un domaine de liaison aux ARN de type RRM, en N terminal, suivi d'un domaine RS riche en sérines et en arginines en C terminal. Les protéines SR additionnelles possèdent une structure moins conservées mais des activités similaires aux protéines SR (adapté de 41,42).

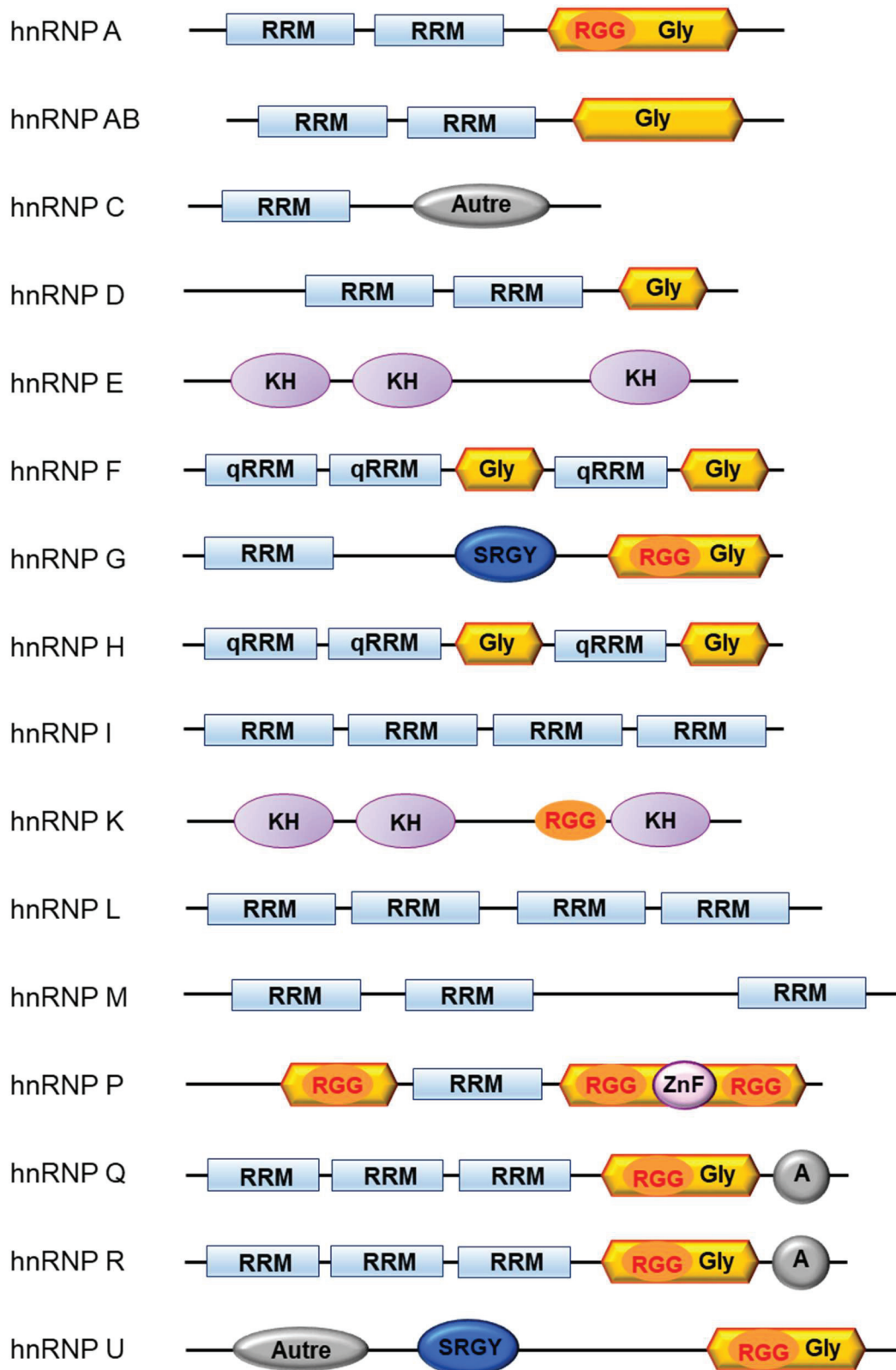
Bien d'autres protéines possèdent aussi un domaine SR mais ont une structure beaucoup moins conservée qui ne comporte pas forcément de domaine de liaison à l'ARN. Ces facteurs sont dits relatifs aux protéines SR. Ils peuvent interagir avec les protéines SR et posséder un site d'activité enzymatique : c'est le cas des protéines kinases CLK (CDC-like kinase, avec un domaine SR et un domaine kinase) qui participent à la régulation de la phosphorylation des protéines SR. D'autres facteurs relatifs aux SR interviennent dans des processus comme le remodelage de la chromatine, la transcription ou le cycle cellulaire (42).

### 1.2.2. Les hnRNP

Les hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins) comptent une vingtaine de membres. Elles sont présentes dans tous les tissus, avec une stœchiométrie variable. Certaines hnRNP sont très abondantes : les hnRNP majeures nommées hnRNP-A1 à U forment les « hnRNP coeur ». Les hnRNP mineures sont moins abondantes, et leur interaction avec l'ARN est plus labile, ou restreinte à une catégorie d'ARN spécifique (43,44). L'ensemble des hnRNP s'assemble en fonction de la séquence de l'ARN, du niveau d'expression des chaque hnRNP et de leurs PTM (45). Du fait de leur présence en très large excès dans la cellule, une partie des interactions des hnRNP avec les ARN se fait de façon non spécifique.

La structure des hnRNP est plus variable que celle des protéines SR : elle consiste en un ou plusieurs domaines de liaison à l'ARN et au moins un domaine auxiliaire qui régule l'interaction avec d'autres protéines et la localisation sub-cellulaire des hnRNP (Figure 5). Le plus commun et le plus caractérisé des domaines de liaison à l'ARN au sein des hnRNP est le RRM, avec ses deux motifs conservés RNP1 et 2. Des hnRNP peuvent présenter au sein de régions riches en glycines, une boîte RGG. Elle a été identifiée chez l'hnRNP-U et se caractérise par des répétitions très proches de tripeptides Arg-Gly-Gly espacés par des résidus aromatiques Phe et Tyr. La boîte RGG est suffisante pour permettre à la protéine de lier l'ARN, mais peut aussi être associée à des motifs RRM, comme chez hnRNP-A1 et G par exemple (46). Les résidus Arg de la boîte RGG peuvent être méthylés permettant une modulation de la liaison aux ARN (47). Les hnRNP peuvent aussi présenter un domaine type KH, présent dans les hnRNP-K et E. Les domaines auxiliaires n'ont pas de séquence consensus, mais les plus fréquents et les mieux caractérisés sont des domaines riches en glycine, retrouvés dans les hnRNP-A et G notamment (48,49).

hnRNP-G/RBMX présente ainsi un domaine RRM en N terminal, une boîte SRGY et une boîte RGG du côté C terminal. Les boîtes SRGY sont des domaines de 37 AA riches en sérine, arginine, glycine et tyrosine qui permettent l'interaction avec d'autres protéines. RBMX en compte une, qui n'est pas aussi conservée que celles présentes chez son paralogue RBMY. RBMY, localisé sur le chromosome Y, est exprimé exclusivement dans les testicules alors que RBMX est exprimé de façon ubiquitaire mais à des niveaux variables en fonction des tissus humains (49–51). Le génome



**Figure 5. Structure des protéines hnRNP.**

Les protéines hnRNP présentent au moins un domaine de liaison à l'ARN (RRM, KH ou ZnF). Elles peuvent comporter un domaine SRGY riche en sérine, arginine, glycine et tyrosine et un ou plusieurs domaines auxiliaires comme les domaines riches en glycine (Gly) dans lesquels on peut trouver des boîtes RGG avec des répétitions Arg-Gly-Gly (adapté de 52).

humain présente aussi plusieurs copies de rétrogènes de RBMX, dont deux sont identiques à 92-96% au gène RBMX : RBMXL1 et RBMXL9 (50).

Les hnRNP exercent un rôle d'empaquetage des ARNpré-m (ARN pré-messager) pendant leur maturation. Elles interviennent aussi dans les étapes de transcription, d'export, de localisation, et de stabilité des ARNm, même si leurs rôles sont moins précisément décrits que dans le cas des protéines SR. Certaines d'entre elles interagissent avec l'ARN dans le noyau et le cytoplasme et naviguent donc entre ces deux compartiments (53).

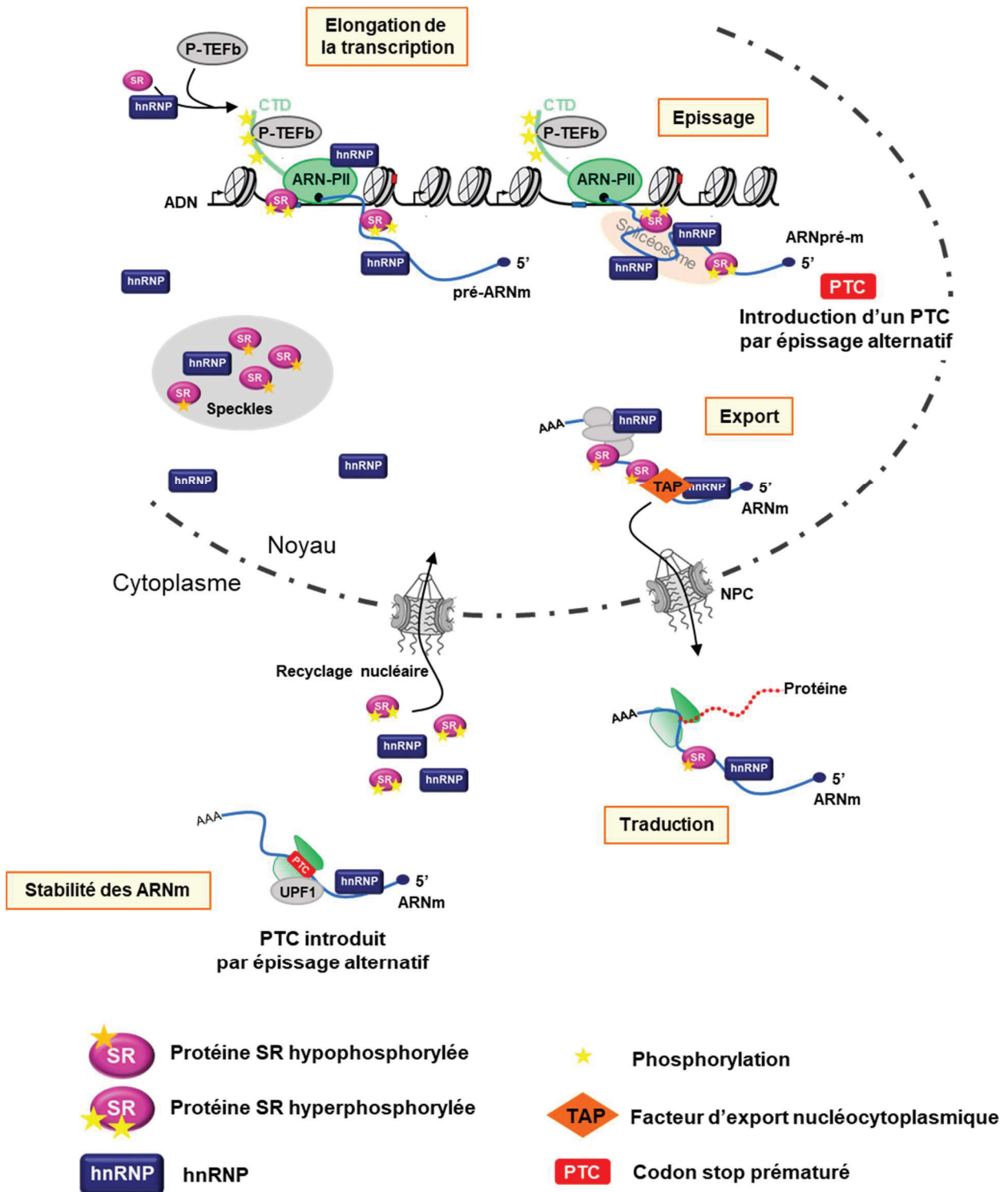
### **I.3. Les fonctions régulatrices canoniques des RBP**

Les RBP contrôlent tous les aspects de la biologie des ARN. La liaison des RBP aux ARN peut être stable, avec certaines RBP qui restent liées à l'ARN de sa transcription jusqu'à sa traduction et/ou dégradation, ou transitoire, lors d'une étape particulière comme l'épissage ou le transport. Toutes ces protéines forment un complexe dynamique et constituent le code mRNP qui détermine le destin des ARNm (Figure 6).

#### ***1.3.1. Régulation de la transcription***

L'association entre RBP et ARN débute dès la transcription du gène en un ARNpré-m par l'ARN-Pol II (ARN polymérase II), et les RBP prennent part à cette étape. Les protéines SR sont concentrées dans des corps nucléaires nommés Speckles (cf §1.4) et recrutées au niveau des sites de transcription dès le début de ce processus en interagissant avec le CTD (Domaine C terminal) de l'ARN-Pol II responsable de la synthèse des transcrits (54). La phosphorylation du CTD de l'ARN-Pol II est importante car elle permet les interactions avec un éventail de facteurs de maturation des ARNpré-m (épissage, polyadénylation, export ...) et surtout pour l'élongation des transcrits (55). hnRNP-A1/A2 intervient dans l'activation de la transcription, en permettant la libération du complexe P-TEFb (Positive Transcription Elongation Factor) (56). De plus, la kinase cdk9 (Cyclin dépendant kinase 9), appartenant à ce complexe d'élongation de la transcription, phosphoryle la Ser2 du CTD de l'ARN-Pol II





**Figure 6. Rôle des protéines SR et hnRNP dans le métabolisme des ARNm.**

Les protéines SR et hnRNP régulent la transcription en activant l'ARN-Pol II (ARN polymérase II). Elles régulent l'épissage constitutif et alternatif des ARNpré-m. Les protéines SR et hnRNP restent liées aux ARNm et certaines d'entre elles participent à leur export nucléo-cytoplasmique. Elles peuvent ensuite être recyclées dans le noyau, ou participer à la régulation des étapes cytoplasmiques du métabolisme des ARNm. L'état de phosphorylation des protéines SR module leur localisation sub-cellulaire. Les protéines SR et hnRNP participent à la traduction des protéines. Les hnRNP modulent le recrutement des facteurs de dégradation des ARNm par la voie NMD (non-sens mediated decay). Les protéines SR ont un rôle indirect dans la stabilité des ARNm : elles peuvent induire l'inclusion d'un codon stop prématuré lors de l'épissage, qui favorise le recrutement d'UPF1, impliqué dans la dégradation des ARNm par le NMD.

ce qui améliore l'efficacité de transcription : ce processus est notamment contrôlé par des protéines des familles SR et hnRNP (SRSF2/SC35 et hnRNP-P2/FUS) qui interagissent avec la kinase cdk9 et permettent cette phosphorylation (57,58).

Les hnRNP peuvent activer la transcription par une action au niveau des promoteurs. Par exemple hnRNP-K se lie au niveau de différents promoteurs associés à des facteurs de transcription pour moduler leur transcription, et notamment activer celle de p53. hnRNP-G/RBMX a elle aussi été décrite pour son rôle d'activateur de la transcription, dans le foie : elle augmente l'activité du promoteur de SREBP-1c, en particulier chez les souris qui subissent un régime riche en fructose, pour induire la synthèse d'une enzyme qui régule les enzymes lipogéniques hépatiques (59). hnRNP-G/RBMX cible aussi le promoteur du gène Txnip, un suppresseur tumoral connu, et le transactive, ce qui induit un effet suppresseur sur la prolifération tumorale. Ainsi, les hnRNP sont aussi impliquées dans les processus de cancérogénèse, puisque la sous-expression de hnRNP-G/RBMX est associée à une augmentation de la prolifération tumorale dans certains types de cancers (60).

Les RBP sont donc déjà recrutées lors de la transcription et peuvent interagir avec les sites qui contrôlent l'épissage dès la synthèse des ARNpré-m, permettant d'établir un couplage étroit entre transcription et épissage des ARN. Ainsi, un changement dans la cinétique d'élongation d'un transcrit affecte la vitesse de présentation des sites d'épissage à la machinerie d'épissage, ainsi que le recrutement des facteurs d'épissage, menant à une modulation de la sélection des sites épissés (61).

### ***1.3.2. Régulation de l'épissage***

Les mécanismes d'épissage, et notamment d'épissage alternatif permettent de considérablement moduler le répertoire de protéines produites par la cellule en réponse à des stimuli internes ou externes. Dans le noyau, les gènes sont transcrits en ARNpré-m qui contiennent des séquences dites introniques et exoniques. Les introns sont excisés et tous les exons reliés entre eux lors du processus d'épissage constitutif. L'épissage alternatif désigne quant à lui une sélectivité des sites d'épissage,

qui permet de moduler l'inclusion de certains exons, aboutissant à l'expression de plusieurs isoformes protéiques à partir d'un même gène (62).

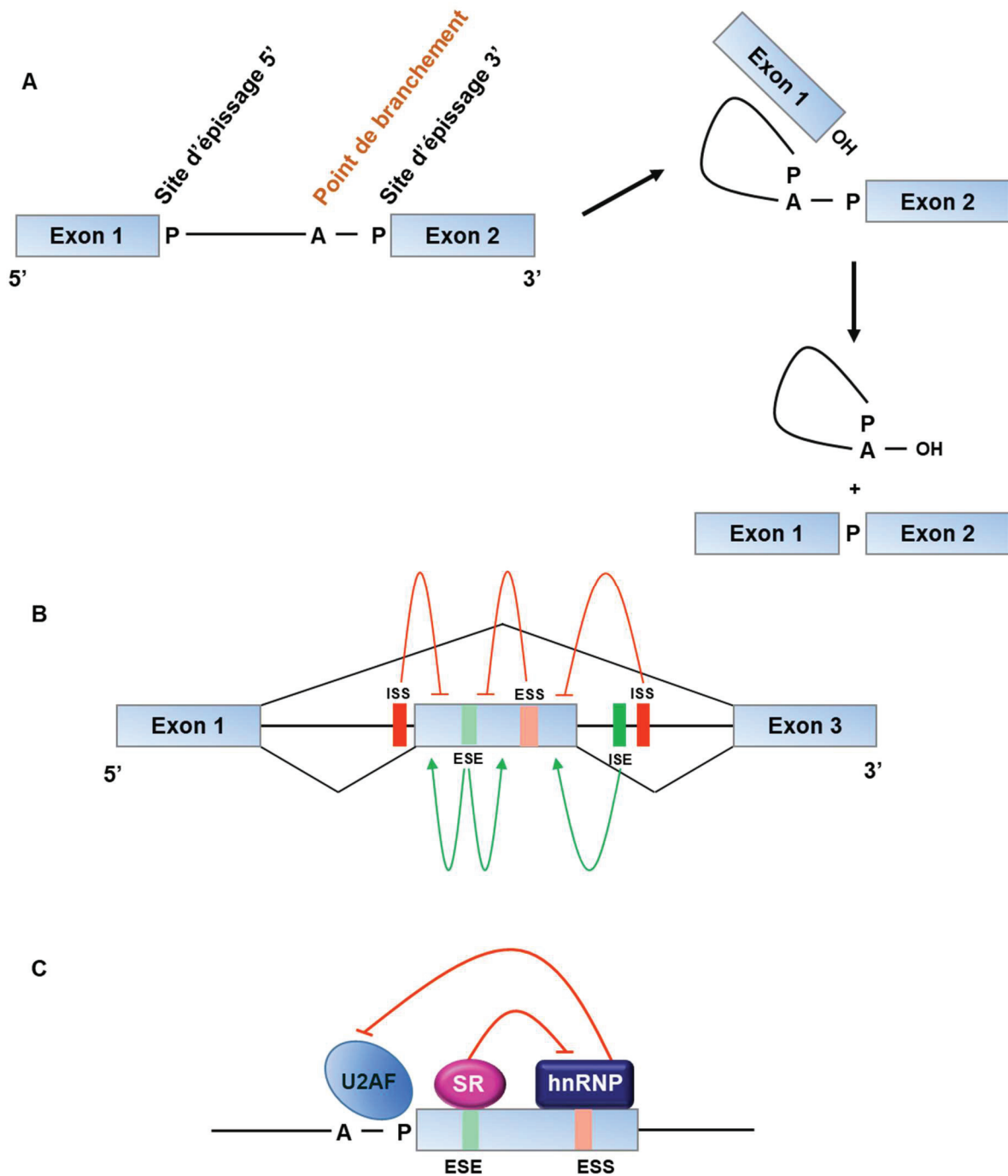
- **Le mécanisme d'épissage constitutif**

Les RBP se lient aux ARN naissants et recrutent le spliceosome, le complexe ribonucléoprotéique qui excise les introns et relie les exons. Le spliceosome est un complexe composé de 5 sous unités (U1, U2, U6/4, U5 et U6/4/5) formées par de petits ARN (snRNA pour small nuclear RNA) auxquels se lient différentes protéines de type Sm ou LSm (63).

La position des introns en 5' et 3' est définie par des sites d'épissage qui sont des séquences riches en pyrimidine et en petit motifs conservés, souvent désignés par site donneur et accepteur d'épissage (Figure 7A). Lors de la réaction d'épissage, ces deux sites sont reconnus par les complexes U1snRNP et U2AF, respectivement. Un troisième site, dénommé point de branchement et localisé en amont du site d'épissage 3' qui est, lui, reconnu par SRSF1. SRSF1 et U2AF sont dites facteurs auxiliaires d'U2snRNP puisqu'elles permettent son recrutement au point de branchement. Les autres protéines du spliceosome sont ensuite recrutées séquentiellement, et conduisent à la coupure du site 5' d'épissage et à la formation d'une liaison covalente entre celui-ci et le point de branchement : on obtient une structure en lasso. Une seconde coupure est réalisée sur le site d'épissage en 3' ce qui libère l'intron, puis les exons sont reliés (64). Les protéines relatives aux SR semblent aussi faciliter le recrutement de U4/U6-5 pour la formation du spliceosome, via SRrp65 et SRrp110 (65). En plus d'intervenir dans la régulation de la dynamique de la structure du spliceosome durant l'épissage constitutif, les RBP ont un rôle très important lors de l'épissage alternatif.

- **Le mécanisme d'épissage alternatif**

L'épissage alternatif permet une sélection des sites d'épissage au sein d'un ARNpré-m. Ce mécanisme permet de générer plusieurs ARNm à partir d'un même transcrit, et il intervient dans 90% des transcrits multi-exoniques chez l'Homme. La reconnaissance différentielle des sites d'épissage est modulée par l'interaction de RBP sur des séquences *cis*-régulatrices des ARNpré-m.



**Figure 7. L'épissage des ARNpré-m.**

(A) Séquences d'épissage exoniques et introniques des ARNpré-m. Les protéines du spliceosome et les RBP associées permettent le clivage du site d'épissage en 5' et sa liaison au point de branchement, puis le site d'épissage en 3' est à son tour clivé pour libérer l'intron. Les exons sont alors reliés. (B) Les séquences *cis*-régulatrices des ARNpré-m sont impliquées dans la régulation de l'épissage alternatif : les séquences exoniques et introniques activatrices (ESE et ISE respectivement, en vert) activent l'exclusion de l'exon ; les séquences exoniques et introniques inhibitrices (ESS et ISS respectivement, en rouge) favorisent l'inclusion de l'exon dans la séquence de l'ARNm. (C) Modèle d'action majeur des protéines SR et des protéines hnRNP : les protéines SR se fixent aux ESE et activent l'épissage de l'exon alternatif en inhibant l'action des protéines répressives de l'épissage comme les hnRNP ; les hnRNP se fixent aux ESS et inhibent l'action des protéines d'épissage comme U2AF.

Dans les exons on parle de séquences activatrices ESE (Exon Splicing Enhancer) ou inhibitrices ESS (Exon Splicing Silencer). Dans les introns, ces mêmes séquences sont désignées ISE (Intron Splicing Enhancer) et ISS (Intron Splicing Silencer) (66) (Figure 7B). L'action des RBP sur ces séquences se fait par stabilisation ou inhibition de la liaison des facteurs généraux d'épissage. Les protéines SR et les hnRNP sont les médiateurs les plus importants de l'inclusion des exons, les premières plus connues pour leur rôle d'activateur de l'épissage, et les secondes pour leur rôle d'inhibiteur, *via* leur interaction avec les I/ESE ou les I/ESS respectivement.

Les séquences ESE sont principalement reconnues par les protéines de la famille SR qui préviennent les sauts d'exon (67,68). En se liant aux ESE, les protéines SR ont la faculté de favoriser et stabiliser la liaison des facteurs U1snRNP et U2AF de part et d'autre de l'exon, ce qui activerait l'épissage (69). Un autre mode d'action a été proposé pour expliquer l'action des protéines SR : elles pourraient agir comme des antagonistes de l'activité des hnRNP, qui elles se lient aux ESS pour inhiber le site d'épissage et donc favoriser le saut d'exon (Figure 7C). En particulier SRSF1 et SRSF2 se lient aux ESE ainsi qu'à des motifs en amont, alors que hnRNP-A1 se lie à son ESS cible, ce qui permet le recrutement d'hnRNP-A1 supplémentaires. Dans le cas de l'épissage de l'ARNpré-m Tat d'HIV-1, il a été montré que l'interaction de SRSF1 avec les motifs en amont de l'ESE empêche le recrutement des hnRNP-A1 secondaires, favorisant ainsi l'inclusion de l'exon (70). L'activité des protéines SR et hnRNP dépend de leur fréquence de liaison aux divers sites régulateurs d'épissage. En effet, le ratio entre hnRNP-A1 et protéines SR, en particulier SRSF1, varie en fonction des tissus et du stade de développement et détermine la régulation de l'épissage alternatif (71). De plus, si la distance entre les séquences activant l'épissage et le site d'épissage lui-même augmente, l'inclusion de l'exon est défavorisée. En augmentant le nombre de sites de liaison des protéines SR, cet effet est contrecarré (72).

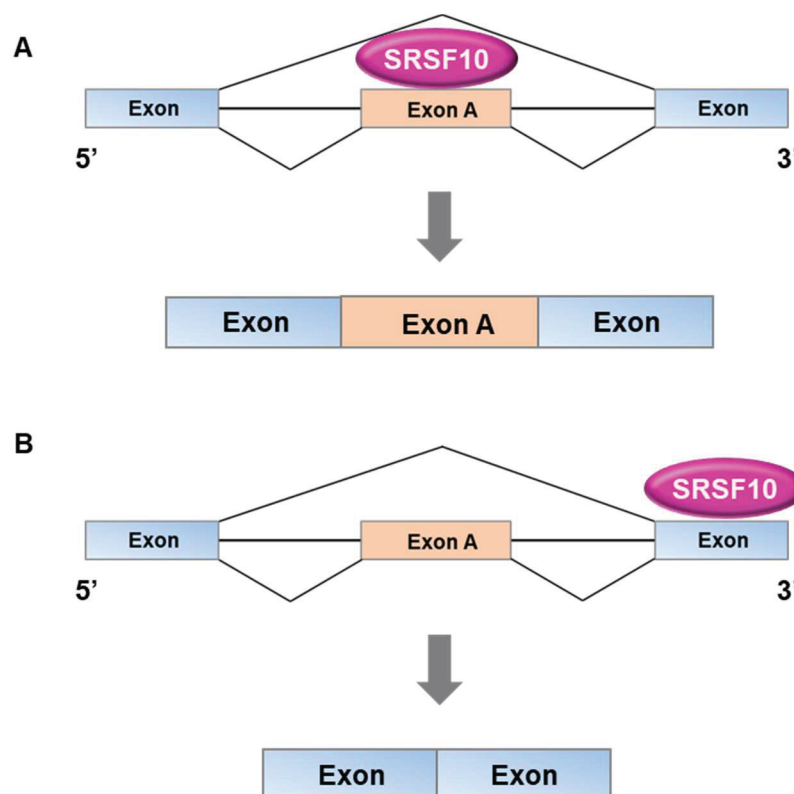
L'épissage alternatif peut aussi conduire à la rétention d'intron. La rétention d'intron est un évènement d'épissage alternatif commun chez les plantes, les champignons et les unicellulaires eucaryotes, mais il était peu décrit chez les humains. Ces dernières années, différentes études ont montré une variété de rôles de la rétention d'intron dans les cellules humaines. La rétention d'un intron peut induire une rétention nucléaire des ARNm. Elle est aussi souvent associée à une modulation de

l'expression des gènes *via* la régulation de la stabilité des ARNm. La rétention d'intron peut en effet entraîner la création de codons de terminaison prématurés menant à la dégradation de l'ARNm ou à des formes tronquées des protéines. Au contraire la rétention d'un intron dans la région 3'UTR de l'ARNm peut stabiliser cet ARN. Les événements de rétention d'intron semblent stimulés par des RBP spécifiques, notamment les hnRNPA1, L, et H (73), alors que les protéines SR seraient majoritairement des répresseurs de ce phénomène (74).

- **Rôles de SRSF10 dans l'épissage alternatif**

De façon intéressante, il a été montré que dans certaines conditions, des protéines SR ont un rôle inhibiteur de l'épissage. C'est le cas de SRSF1 et SRSF3 quand elles ont pour cible l'ARNpré-m de SRSF3 et de SRSF10. SRSF10 présente un fonctionnement différent des autres protéines SR, bien que sa structure soit typique de cette famille (Figure 4). SRSF10 est un répresseur général de l'épissage, notamment durant la mitose ou suivant un choc thermique, et son absence entraîne un prolongement de la phase G2/M ou une incapacité de la cellule à survivre au choc thermique (75,76). L'activité répressive de SRSF10 est finement conditionnée par sa phosphorylation. Son activité d'inhibition s'exerce par sa forme déphosphorylée, ce qui contraste avec les protéines SR standard, qui sont inactives sur l'épissage dans cet état (77,78) (cf §1.4.2). La protéine SRSF10 déphosphorylée empêche notamment l'association des snRNP avec les ARNm immatures : SRSF10 interagit avec U1snRNP et interfère avec la reconnaissance stable du site d'épissage en 5', inhibant donc l'assemblage du spliceosome. En l'absence de stress, SRSF10 est retrouvée sous une forme phosphorylée (P-SRSF10), protégée de la déphosphorylation par les protéines 14-3-3 (79). La forme phosphorylée de SRSF10 est présente dans tous les types de tissus mais son rôle est resté longtemps inconnu. P-SRSF10 peut agir en activateur de l'épissage de façon séquence spécifique en interagissant avec U1snRNP et en permettant le recrutement du spliceosome. Cependant, il semble que cette activité activatrice de P-SRSF10 soit faible comparée au potentiel inhibiteur de SRSF10, et qu'elle puisse s'exercer uniquement *via* des sites très forts d'activation de l'épissage (80). De façon intéressante, l'activité de SRSF10 dans l'épissage est strictement dépendante de ses domaines RS puisqu'en les remplaçant par un domaine RS d'une autre protéine SR, SRSF10 est inactive (81).

Différentes publications ont utilisé le séquençage ARN pour identifier des cibles de l'épissage alternatif contrôlées par SRSF10. Une analyse transcriptomique chez le poulet a permis de mettre en évidence un effet différentiel de SRSF10 sur l'épissage en fonction de son site de liaison : si SRSF10 se fixe sur la cassette d'un exon A, elle active l'inclusion de cet exon (Figure 8A) ; au contraire, si SRSF10 se fixe sur un exon constitutif en aval de l'exon A, il promeut l'exclusion de l'exon A (Figure 8B) (82). Dans une autre étude, le rôle activateur de SRSF10 sur l'exclusion d'exon a été mis en évidence dans le cas d'un transcrite codant la protéine Lipin1 $\alpha$ , impliquée dans l'initiation de la différenciation cellulaire des adipocytes. SRSF10 se fixe à l'exon 8 du transcrite de la Lipin1 et induit l'exclusion de l'exon 7, menant à la production de l'isoforme Lipin1 $\alpha$ . L'isoforme Lipin1 $\beta$ , synthétisée à partir du transcrite comprenant l'exon 7, est impliquée dans la lipogenèse de l'adipocyte différenciée (83). L'état de phosphorylation de SRSF10 n'a cependant pas été soulevé dans ces études et il est possible que la forme liant l'exon alternatif soit phosphorylée, alors que celle liant l'exon en aval soit déphosphorylée.



**Figure 8. Effet différentiel de SRSF10 sur l'épissage alternatif.**

Si SRSF10 se fixe sur l'exon alternatif (Exon A), elle active son épissage (inclusion). Au contraire, si SRSF10 se fixe sur l'exon en aval, elle réprime l'épissage, ce qui conduit à l'exclusion de l'exon A.

L'expression de SRSF10 est modulée dans le contexte de cellules cancéreuses: SRSF10 est surexprimée dans les tumeurs colorectales à forte croissance où l'on retrouve aussi l'expression d'une isoforme particulière de BCLAF1 (facteur de transcription 1 associé à bcl-2) générée par l'inclusion de l'exon 5 *via* SRSF10 (84).

Le rôle double de SRSF10 dans l'épissage a été illustré dans une étude de 2015 de *Wei et al.* qui a montré que SRSF10 permet l'inclusion d'exons alternatifs pour générer une protéine impliquée dans la différenciation des myoblastes en cellules musculaires striées. En parallèle, ils ont démontré que SRSF10 réprime l'inclusion d'un exon de PGC1 $\alpha$ , permettant l'expression d'une protéine fonctionnelle pour la régulation de la production de glucose dans les hépatocytes murins (85).

- **TRA2 $\beta$  et RBMX : effets agonistes ou antagonistes sur l'épissage alternatif**

La protéine SR-like TRA2 $\beta$  est un activateur de l'épissage très conservé dans le règne animal. Le gène *tra2* code pour une protéine unique chez les insectes, impliquée dans la différenciation sexuelle et la spermatogenèse. Ce gène s'est dupliqué chez les vertébrés, résultant en 2 protéines identiques sur 63% de leur séquence en AA : TRA2 $\alpha$  et TRA2 $\beta$ . Ces deux protéines agissent plutôt sur l'épissage alternatif, en se liant aux exons de manière séquence spécifique pour favoriser leur inclusion (86). TRA2 $\alpha$  interagit avec d'autres protéines SR pour un épissage efficace : par exemple elle se fixe à la séquence ESE4 de l'ARNpré-m de la GnRH (Gonadotrophin-releasing Hormone) et avec la coopération de SRSF7 et SRSF9, permet la maturation d'un ARNm GnRH fonctionnel (87). TRA2 $\beta$  contrôle l'épissage de différents transcrits en collaboration avec d'autres régulateurs de l'épissage, comme dans le cas de la CGRP (calcitonin gene related peptide) (88), de la protéine Tau (89) ou du facteur SMN1 (Survival Motor Neuron 1).

Le cas de la maturation de l'ARNpré-m SMN illustre une coopération non conventionnelle entre protéines SR et hnRNP. La protéine SMN est exprimée de façon ubiquitaire et elle est importante pour l'assemblage du spliceosome et le transport de la  $\beta$ -actine dans les neurones. Une baisse de son expression entraîne des amyotrophies spinales plus ou moins sévères (90,91). Ainsi, la protéine SMN fonctionnelle est synthétisée à partir d'un ARNpré-m dans lequel l'exon 7 doit être inclus. Cela survient grâce à TRA2 $\beta$  qui se fixe spécifiquement à une séquence ESE



de l'exon 7 et aux protéines SRSF1 et SRSF9, qui stimulent l'inclusion de l'exon (26,92). Dans le cas d'une mutation homozygote de *smn1* conduisant à un défaut d'expression de la protéine correspondante, il existe une autre copie du gène, *smn2*, mais qui comporte une substitution inactivant la séquence ESE de l'exon 7. Le défaut de recrutement de SRSF1 ne permet pas la reconnaissance du site d'épissage en 3' et provoque donc le saut de l'exon 7. Ceci mène à la production d'une forme tronquée de SMN2, moins stable et moins active, qui ne permet pas de compenser un défaut d'expression de SMN1 (92). Or, il a été montré que TRA2 $\beta$  et RBMX interagissent et stabilisent réciproquement leur activité. TRA2 $\beta$  peut en effet se fixer sur l'exon 7 en l'absence de l'ESE : un site de liaison AGAA est reconnu par son RRM, puis les extrémités C et N terminale de TRA2 $\beta$  interviendraient dans le recrutement de RBMX et SRSF9 sur leur motif de reconnaissance adjacent, permettant l'inclusion de l'exon. Ainsi, malgré l'absence de l'ESE sur l'exon 7, l'interaction TRA2 $\beta$  - RBMX favorise l'inclusion de l'exon 7 et permet la synthèse d'une protéine « SMN2 FL » (SMN2 Full Length) qui peut compléter l'absence de SMN1 (25,93,94). Dans cet exemple l'action de TRA2 $\beta$  et RBMX n'est pas antagoniste, contrairement aux relations conventionnelles entre protéines SR et hnRNP.

Ces dernières années, les études concernant RBMX ont mis l'accent sur son activité en partenariat avec TRA2 $\beta$ . Cependant, si pour l'expression des gènes *smn* leur activité est synergique, il existe beaucoup d'exemples où de façon plus conventionnelle, elle est antagoniste. C'est le cas dans les muscles squelettiques, pour l'inclusion de l'exon SK de l'ARNpré-m de l' $\alpha$ -tropomyosine : TRA2 $\beta$  se lie à un site ESE pour stimuler l'inclusion de l'exon, alors que RBMX se lie à un site différent du même exon pour antagoniser l'action de TRA2 $\beta$ . Un mécanisme similaire a été observé dans les cellules musculaires cardiaques pour un pseudo exon de la dystrophine. Le ratio RBMX/TRA2 $\beta$  varie en fonction de ces tissus et permettrait de favoriser soit l'inclusion soit l'exclusion de l'exon (51). Plus largement, RBMX peut aussi antagoniser l'activité de protéines relatives aux SR, comme celle de SRp86 qui stimule l'inclusion de l'exon v5 de CD44 (95).

La localisation nucléaire et les propriétés de liaison aux ARN des protéines SR et hnRNP ont orienté beaucoup de recherches sur l'implication de ces RBP dans les étapes nucléaires du métabolisme des ARNm. Mais, certaines de ces protéines

naviguent entre noyau et cytoplasme (44,96), suggérant qu'elles interviennent aussi dans les étapes d'export et, d'une façon plus générale, dans le compartiment cytoplasmique.

### ***1.3.3. Régulation de l'export nucléo-cytoplasmique des ARNm***

La maturation des ARNpré-m est étroitement liée à leur export nucléo-cytoplasmique *via* les pores nucléaires. Ainsi, les protéines SR et hnRNP qui interviennent dans la transcription et l'épissage des ARNpré-m restent pour certaines d'entre elles fixées aux ARNm matures et participent à leur export nucléo-cytoplasmique grâce à leur capacité à faire la navette entre le noyau et le cytoplasme (Figure 6, cf §1.4.1).

SRSF1, SRSF3 et SRSF7 passent du noyau au cytoplasme en interagissant avec l'ARNm et le facteur d'export TAP/NXF1, responsable du transport des ARNm vers le cytoplasme par les pores nucléaires. Ces trois protéines sont nécessaires à l'export des ARNm après épissage et servent de protéines adaptatrices durant ce processus (97,98). Le domaine SR, bien qu'insuffisant à ces fonctions, est crucial pour la prise en charge des ARNm préférentiellement épissés par la machinerie d'export. Pour leurs fonctions durant l'épissage, SRSF1, 3 et 7 sont hyperphosphorylées, puis leur déphosphorylation progressive déclenche leur interaction avec TAP/NXF1 pour l'export de l'ARNm (99).

Les protéines hnRNP participent aussi à la prise en charge des ARNm épissés pour leur export. Piñol-Roma et Dreyfuss ont démontré que l'hnRNP-A1 se fixe à la queue polyA des ARNm dans le noyau et pourrait être nécessaire pour l'export. Au contraire, d'autres hnRNP comme hnRNP-C sont strictement nucléaires et pourraient agir pour retenir les ARNpré-m dans le noyau lorsqu'il ne sont pas épissés : hnRNP-C se fixant plus spécifiquement à des régions introniques, il est nécessaire qu'elle soit éliminée pour que l'ARNm soit exporté (100). Contrairement aux protéines SR, les modalités d'interaction avec les facteurs d'export et les modifications post-traductionnelles éventuellement requises par les hnRNP pour participer à la rétention ou l'export des ARN ne sont pas encore connues. S'il est possible que les hnRNP soient exportées de façon passive avec l'ARNm, l'hypothèse la plus mise en avant est

celle d'un rôle actif d'hnRNP spécifiques qui s'associeraient aux ARNm pour permettre leur export.

#### ***1.3.4. Régulation de la stabilité des ARNm***

Une fois dans le cytoplasme, les ARNm ont une durée de vie très variable, contrôlée par leur interaction avec des RBP. A la fin de la traduction, les ARNm sont dégradés par la voie « basal decay » qui intervient de façon rapide, séquentielle et irréversible. La dégradation est initiée par la dé-adénylation (ou raccourcissement de la queue poly(A)), puis la coiffe en 5' est éliminée, et le reste de l'ARNm dégradé par des enzymes exonucléasiques. Le contrôle qualité des ARNm met en jeu d'autres processus de dégradation, qui permettent d'éliminer des ARNm aberrants. Un des mieux caractérisé est le NMD pour « Nonsense Mediated Decay » qui cible les ARNm contenant des codons stop prématurés (PTC). Lors de l'épissage alternatif, l'inclusion ou l'exclusion de certains exons peut entraîner l'apparition d'un PTC qui sera détecté par le ribosome lors de la traduction (Figure 6). Cette reconnaissance induit l'activation d'UPF1 qui inhibe la traduction de l'ARNm et favorise sa dégradation par le recrutement de Smg6, une endonucléase qui agit au niveau du site contenant le PTC. Puis les exonucléases de la voie classique de dégradation des ARNm, Dis3L2 et Xrn1, dégradent les fragments générés (101,102).

Les protéines SR ont été impliquées dans la régulation de la voie NMD puisque la surexpression de certaines d'entre elles (SRSF1, SRSF2, SRS5 et SRSF6) augmente l'activité NMD et ce de façon dépendante de leur domaine SR. Ce mécanisme est indépendant d'une localisation cytoplasmique des protéines SR : il met en jeu en partie des protéines SR strictement nucléaires. De plus, l'utilisation de protéines SR navettes chimériques (comme SRSF1) contenant un signal de rétention nucléaire n'abolit pas la dégradation des ARNm cible des SR *via* le NMD (103). Les protéines SR nucléaires pourraient augmenter la dégradation des ARNm en favorisant l'apparition de PTC et/ou, comme suggéré pour SRSF1, pourraient moduler le site de NMD et le déplacer du cytoplasme vers le noyau, avant que l'ARNm anormal soit exporté hors du noyau (104). Les protéines SR ont une capacité plus ou moins importante à favoriser le NMD, SRSF1 ayant la plus forte. Ainsi, la variation d'expression de ces protéines peut expliquer la variation de la réponse NMD selon les tissus.

La dégradation des ARNm contenant des PTC constitue un mécanisme de régulation post-transcriptionnel du niveau d'expression des gènes. De façon intéressante, ce mécanisme est utilisé par les RBP qui peuvent ainsi s'autoréguler entre elles (105,106). Ainsi, TRA2 $\beta$  induit l'inclusion d'un exon délétère lors de l'épissage de l'ARNm de TRA2 $\alpha$  et de son propre ARNm (105,107). Ceci se traduit par l'apparition d'un PTC, qui sera détecté par le NMD, empêchant la synthèse de la protéine. La surexpression de TRA2 $\beta$  augmente l'inclusion de l'exon délétère et induit donc la sous expression de TRA2 $\alpha$  par rétrocontrôle négatif.

Les protéines SR agissent aussi sur la stabilité des ARN par un mécanisme indépendant du NMD : dans le cytoplasme, SRSF1 se fixe par exemple à des sites spécifiques sur les ARNm ce qui provoque leur déstabilisation (108). De façon similaire, les hnRNP interviennent dans la régulation de la stabilité de nombreux ARNm. L'hnRNP-D est très connue pour son rôle dans la déstabilisation des ARNm : elle a été identifiée dans plusieurs études pour sa capacité de liaison aux éléments riches en AU (ARE) pour entraîner la dégradation des ARNm ciblés. Les hnRNP-D ne possèdent pas d'activité ribonucléolytique propre mais forment des dimères qui s'associent aux régions riches en ARE de façon compétitive avec des protéines stabilisatrices des ARNm. Les dimères permettraient le recrutement d'un complexe protéique qui régule la transduction du signal recrutant la machinerie de dégradation des ARNm (109,110). Cet effet de hnRNP-D peut être inhibé, comme dans le cas de l'ARNm de l' $\alpha$ -globine qui possède une stabilité exceptionnelle. La 3'-UTR (Untranslated Transcribed Region) de l'ARNm de l' $\alpha$ -globine se lie à un complexe de stabilisation où on retrouve hnRNP-E1, E2 ainsi que la PABP-C (cytoplasmic poly(A)-binding protein) qui inhibent l'action des protéines déstabilisantes par un mécanisme qu'il reste à préciser (111).

### ***1.3.5. Régulation de l'efficacité de traduction des ARNm***

Les RBP contrôlent l'efficacité de traduction des ARNm de façon indirecte en modulant l'épissage alternatif des ARNm des acteurs de la traduction, mais aussi de façon directe en agissant sur le recrutement et l'activation de ces acteurs (Figure 6).

Les protéines SR qui ont une localisation cytoplasmique interviennent dans ces mécanismes directs. SRSF1 active la traduction des ARNm en interagissant avec une

ESE, pour recruter le complexe mTOR et permettre la phosphorylation et la libération de 4E-BP, un inhibiteur de la traduction cap-dépendante (112,113). D'autres protéines SR sont aussi connues pour leur rôle dans la traduction : SRSF7 favorise la transcription des ARNm avec introns contenant un domaine CTE (constitutive transport element) qui aide à l'export des ARNm non épissés, en permettant l'association de plusieurs ribosomes sur ces ARNm (114). SRSF3 et l'hnRNP-I facilitent la reconnaissance du site IRES (Internal Ribosome Entry Site) par la machinerie de traduction, ce qui permet d'initier la traduction sans la présence de la coiffe en 5'. Ce mécanisme est ainsi principalement utilisé pour la traduction des ARN viraux (115,116).

Certaines RBP ont à la fois une activité de coactivateur et de corepresseur de la traduction. Ainsi, hnRNP-E1 stimule la traduction IRES dépendante de certains ARNm (111). Au contraire, hnRNP-E1 inhibe la traduction de l'ARNm LOX, en se liant avec hnRNP-K à une région non transcrite en 3' de l'ARNm LOX. Cette inhibition est requise lors de la différenciation des cellules érythrocytaires (117).

Ainsi, toutes les fonctions des protéines SR et hnRNP décrites dans le cadre du métabolisme des ARNm rendent compte de l'importance de leur localisation, qui n'est pas exclusivement nucléaire. Les RBP, une fois liées aux ARNpré-m pour leur épissage, peuvent prolonger leur interaction durant l'export et dans le cytoplasme, pour interagir avec des régulateurs post-transcriptionnels des ARNm (Figure 5). Au lieu de multiplier le nombre de protéines pour chaque étape, la cellule optimise les capacités des RBP qui interviennent dans de multiples processus, grâce à une régulation complexe de leur activité et de leur localisation. Pour ce faire, les modifications post-traductionnelles (PTM) des RBP constituent un point critique, notamment leur état de phosphorylation soulevé plusieurs fois dans ce chapitre. Les PTM permettent de contrôler l'activité et le trafic des RBP et de concilier leurs rôles entre noyau et cytoplasme.

## I.4. Localisation et régulation des RBP

### I.4.1. RBP et compartiments cellulaires

Les protéines SR et hnRNP sont retrouvées majoritairement dans le noyau. Dans ce compartiment, deux structures, localisées dans l'espace interchromatinien, sont impliquées dans la maturation et la régulation des ARNm et contiennent un grand nombre de RBP.

Les **Speckles** se caractérisent par une concentration importante en facteurs snRNP et, en particulier en facteurs d'épissages. Ils forment plusieurs agrégats reliés entre eux (structure « mouchetée ») qui peuvent être détectés par la présence de SRSF2/SC35, le composant prototype de ce corps nucléaire (118). Les Speckles se composent de deux structures distinctes : les IGC (Interchromatin Granule Clusters) qui sont les sites de stockage et de recyclage des facteurs d'épissage, et les PF (Perichromatin Fibrils) qui sont les sites de transcription active et d'épissage. Ces structures sont ainsi associées à de l'ADN fortement transcrit, et permettent aux ARN néo-synthétisés d'être immédiatement pris en charge par la machinerie d'épissage. Les Speckles sont des domaines fonctionnels et dynamiques, composés en grande partie par les protéines SR qui sont recrutées des IGC aux PF pour exercer leur activité d'épissage. Si le domaine RS est requis pour leur localisation dans les Speckles, leur état de phosphorylation et la présence du RBD sont aussi indispensables à la migration des SR des IGC aux PF (119). Dans les Speckles sont aussi retrouvées des kinases (120,121) et des phosphatases (122) qui agissent sur les facteurs d'épissage localisés dans ces corps nucléaires. La distribution intranucléaire des hnRNP est en revanche plus diffuse et bien qu'elle chevauche celle des Speckles, elle ne semble pas exclusive à ces structures. Le signal nucléaire des hnRNP est très important au niveau des sites de transcription et d'épissage des ARN<sub>pré-m</sub>, donc à proximité des PF des Speckles. Le signal présent dans le reste du noyau pourrait correspondre à l'activité des hnRNP dans les étapes en aval de l'épissage, sur les ARNm matures pas encore exportés (44). Dans les Speckles, on trouve aussi un long ARN non codant, *MALAT1*, qui interagit avec les protéines SR comme SRSF1, 2 et 3, influence leur recrutement des Speckles aux sites de transcription (123), et participe à la régulation de l'épissage alternatif en modulant la phosphorylation des protéines SR (124). *MALAT1* ne semble

cependant pas essentiel à la formation des Speckles mais pourrait influencer celle d'autres corps nucléaires, les Paraspeckles (125).

Les hnRNP et protéines SR entrent aussi dans la composition des **Paraspeckles** qui sont localisés dans l'espace interchromatinien mais sont bien distincts des Speckles (126). Visibles sous la forme d'un ou deux points discrets dans le noyau, ils se forment à partir d'un ARN long non codant *NEAT1*, sur lequel s'associent de façon coordonnée plusieurs protéines. Une quarantaine de ces composants protéiques sont connus et sont des RBP riches en RBD (RRM, ZnF et KH-domain). La protéine PSPC1 (ParaSpeckles Protein1) est le marqueur identitaire des Paraspeckles, et représente avec NONO et SFPQ le composant intrinsèque le plus étudié (18). Les protéines SR et hnRNP sont aussi des constituants des Paraspeckles : c'est le cas de RBMX, hnRNP-K, hnRNP-P2/FUS et SRSF10 notamment (127).

L'analyse de la localisation des protéines SR et hnRNP a mis en évidence un fort signal nucléaire du fait de l'importance de ces protéines dans le noyau. Mais certaines d'entre elles ont la capacité de naviguer entre noyau et cytoplasme (96,100) ce qui leur permet d'exercer les activités cytoplasmiques explicitées précédemment (§1.3.). Le faible signal cytoplasmique de ces protéines peut s'expliquer par un trafic nucléocytoplasmique intense avec un recyclage nucléaire très rapide. Au-delà de leur présence au niveau des complexes de traduction ou de dégradation, les protéines SR et hnRNP cytoplasmiques peuvent être retrouvées dans des sous-compartiments cytoplasmiques spécifiques. Notamment, les hnRNP-A et E ont été identifiées dans la composition des **P-bodies** (Processing bodies) qui contiennent des ARNm non traduits associés à des protéines de dégradation ou d'inhibition de la traduction (128).

Les **granules de stress** (SG) se forment de façon transitoire à la suite d'un stress environnemental (chaleur, oxydation, UV, hypoxie...) qui entraîne une reprogrammation du métabolisme des ARNm pour favoriser ceux nécessaires à la réparation des dommages liés au stress. Les SG concentrent les ARNm cytoplasmiques dont la transcription est inhibée : les ARNm y sont figés en initiation de traduction, associés à des RBP inhibitrices de la traduction. Ce sont des structures dynamiques qui se désassemblent une fois la cellule remise du stress, et les ARNm libérés reprennent leur traduction (129). Certaines protéines SR sont recrutées dans

les SG : SRSF1 migre dans les SG de façon dépendante de sa capacité de liaison aux ARN, et participe à la régulation du métabolisme des ARNm durant un stress (130). L'activité de liaison aux ARNm est aussi requise par hnRNP-A1 pour sa localisation dans les SG, et cette RBP semble avoir un rôle actif dans la réponse au stress puisque sa déplétion affecte la survie cellulaire (131). SRSF2, SRSF3, SRSF7 et SRSF10 sont aussi retrouvées dans les SG dans une proportion variable. En effet, SRSF1, SRSF3 et SRSF10 seraient relocalisées dans les SG après un stress environnemental et la migration de SRSF7 dans ce compartiment serait plus modeste. Une fraction mineure de SRSF2 présente dans les SG illustre la possibilité pour des RBP strictement nucléaires de pouvoir être redistribuées dans le cytoplasme en cas de stress (41,130). Les capacités de navigation des protéines SR sont aussi différentes selon le stade de différenciation des cellules : SRSF2 et 5 sont principalement nucléaires dans les cellules HeLa, alors qu'elles sont aussi détectées dans le cytoplasme dans les cellules murines pluripotentes P19 : la régulation des transcrits de facteurs de différenciation dépendrait de la capacité de navigation de SRSF5, puis une fois les cellules P19 différenciées, ces capacités seraient drastiquement réduites (132).

Toutes ces structures représentent les différentes plateformes d'interaction entre RBP et ARN, rythmant le cheminement des ARN durant leur métabolisme. Les RBP sont des protéines multifonctionnelles, et elles subissent des modifications post traductionnelles qui régulent leurs activités et leur localisation.

#### ***1.4.2. Modifications post-traductionnelles des RBP***

- **Glycosylation**

Peu de données sont disponibles sur la glycosylation des RBP. A ce jour, RBMX est la seule hnRNP connue pour être glycosylée que ce soit dans des cellules en prolifération ou quiescentes. La glycosylation de RBMX semble nécessaire à ses capacités d'interaction avec d'autres protéines (49). La glycosylation n'a pas été démontrée chez les protéines SR.



- **Méthylation**

Chez les mammifères la méthylation semble promouvoir la localisation nucléaire des protéines SR. En effet, SRSF1 présente trois résidus arginine entre les deux domaines RRM de la protéine qui, quand ils sont méthylés, favorisent la localisation nucléaire de SRSF1. L'inhibition de cette méthylation entraîne une accumulation cytoplasmique de SRSF1 qui se traduit par une modification du profil d'épissage alternatif, une diminution de la dégradation des ARNm par NMD et une augmentation de la traduction (133). La méthylation régule l'affinité de liaison des hnRNP aux ARN : la méthylation des arginines de la boîte RGG de hnRNP-A1 favorise sa liaison aux ARNm (134) et, de façon similaire, favorise la fixation de hnRNP-K à l'ARNpré-m de p53 pour activer sa transcription (135).

- **Acétylation**

Des analyses protéomiques à large spectre ont mis en évidence des sites d'acétylation au niveau de protéines non histones, notamment des protéines SR ainsi que de leurs kinases (136). Ainsi, l'HAT (Histones Acetyl Transferase) de type Tip60 cible spécifiquement SRSF2 et entraîne sa dégradation par le proteasome. Cette acétylation peut être contrecarrée par l'action de la déacétylase HDAC6, qui favorise ainsi l'expression de SRSF2. De plus, Tip60 inhibe la phosphorylation de SRSF2 par SRPK1 et 2 (SR-specific protein kinase 1 et 2) en inhibant la translocation nucléaire de ces kinases (137). Les HAT et HDAC constitueraient ainsi des régulateurs importants de l'expression des protéines SR et de l'activité de leurs kinases, influençant le profil d'épissage des cellules mammifères.

- **Ubiquitination et SUMOylation**

Les RBP sont aussi modifiées par la SUMOylation et l'ubiquitination. L'**ubiquitination** des hnRNP régule leurs activités d'épissage. Par exemple, l'ubiquitination de hnRNP-A1 réprime son activité d'épissage sur le transcrit permettant la synthèse de Rac1b, notamment impliqué dans la migration cellulaire (138). Une étude protéomique a montré que les hnRNP-A1, A3, F, H et K subissent des **SUMOylations** (Sumo : Small Ubiquitin-like Modifier) au niveau de leur RBD mais sans évidence à l'heure actuelle que cela modifie leur affinité pour l'ARN (139).

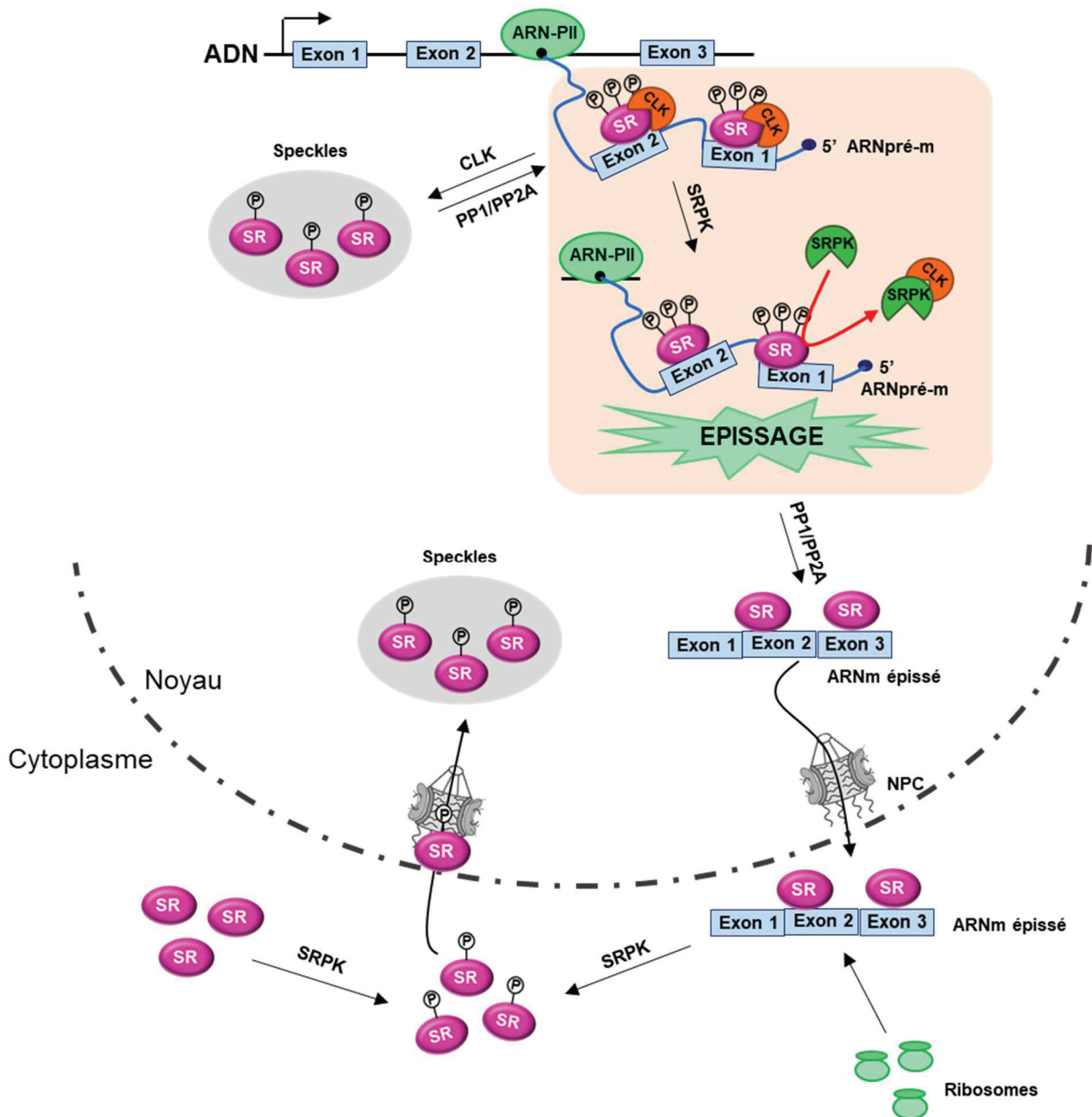
Cependant, la SUMOylation d'hnRNP-K est par exemple nécessaire à son rôle de co-activateur de la transcription de p53, en particulier dans un contexte de dommage à l'ADN (140,141). De façon intéressante, une étude a montré que SRSF1 stimulerait elle-même la SUMOylation de certaines protéines. SRSF1 partage des similarités avec les SUMO E3 ligases, interagit avec l'une d'entre elles, PIAS1 (Protein Inhibitor of Activated STAT-1) et augmente son activité de SUMOylation. De plus, SRSF1 favorise la conjugaison des groupes SUMO sur les facteurs du métabolisme des ARN à la suite d'un choc thermique. Le domaine RRM de SRSF1 est nécessaire et suffisant pour ces fonctions (142). Ces résultats soulèvent la possibilité intéressante selon laquelle les protéines SR pourraient avoir des activités directes de régulation des PTM des RBP.

- **Phosphorylation**

La phosphorylation est la PTM majeure des protéines SR qui se fait au niveau de leur domaine RS grâce aux kinases SRPK et CLK majoritairement (120,143). Les SRPK phosphorylent les dipeptides Arg-Ser, alors que les CLK phosphorylent les dipeptides Arg-Ser mais aussi Ser-Pro des protéines SR (144). Les SRPK sont distribuées de façon plus importante dans le cytoplasme que dans le noyau, alors que les CLK sont plutôt constitutives du noyau et colocalisent en particulier avec les protéines SR dans les Speckles. Ces kinases pourraient ainsi se relayer pour réguler la phosphorylation des protéines SR dans chaque compartiment cellulaire, afin de moduler leur localisation et leur activité métaboliques (145). Bien sûr, des phosphatases telles que PP1 et PP2A sont aussi nécessaires à la dynamique de phosphorylation/déphosphorylation des protéines SR (146).

La libération des protéines SR des Speckles pour la formation du spliceosome requiert la phosphorylation de leur domaine SR par les CLK (120,147). Puis au niveau du spliceosome, une phosphorylation additionnelle par CLK et SRPK permet la continuité de leurs activités d'épissage sur les pré-ARNm (148). Plusieurs études récentes ont élucidé les détails de ces phosphorylations en cascade dans le cas de SRSF1 : la première vague de phosphorylation surviendrait dans le cytoplasme grâce à l'action de SRPK1. Une fois phosphorylé, SRSF1 est transporté vers le noyau, plus précisément vers les Speckles. La sortie de ce facteur des Speckles requiert alors une deuxième vague de phosphorylation orchestrée par CLK-1. La forme hyperphosphorylé de SRSF1 peut alors se fixer aux ARN. Enfin, une deuxième intervention

de SRPK1, dans le noyau, est nécessaire pour dissocier CLK1 de SRSF1 et lui permettre d'exécuter ses fonctions sur l'épissage. Après épissage, SRSF1 est déphosphorylé et transporté dans le cytoplasme avec l'ARNm (149,150) (Figure 9).



**Figure 9. Le rôle des kinases dans la localisation des protéines SR.**

Dans le cytoplasme, les protéines SR déphosphorylées sont phosphorylées par SRPK1 ce qui permet leur import dans le noyau. Des phosphorylations additionnelles induites par CLK1 permettent le recrutement des protéines SR des Speckles aux sites de transcription des ARNpré-m. L'intervention de SRPK1 dans le noyau est nécessaire pour dissocier CLK1 des protéines SR et permettre l'épissage. Une fois l'ARNm épissé, les protéines SR sont déphosphorylées et certaines sont transportées dans le cytoplasme avec l'ARNm (adapté de 147,148).

D'autres facteurs seraient aussi impliqués dans la phosphorylation des protéines SR, comme l'ADN topoisomérase I qui, en plus de ses activités de relaxation de l'ADN super-enroulé, est dotée d'une activité kinase ciblant les protéines SR (151) qui serait importante pour l'épissage ESE-dépendant et l'assemblage du spliceosome (152,153). La protéine kinase B/Akt phosphoryle aussi les protéines SR en réponse à des stimuli externes (hormonaux ou mitogéniques). Cela a pour conséquence la modulation du profil d'épissage alternatif des gènes codant pour des facteurs impliqués dans la transduction de signaux (154,155).

Comme mentionné dans le cas de SRSF1, la déphosphorylation progressive des protéines SR est plutôt associée à des ARNm épissés et pourrait servir de signal pour l'export nucléo-cytoplasmique des ARNm. En particulier, l'interaction des protéines SR navettes avec le facteur d'export TAP/NXF1 est favorisée par l'hypophosphorylation de leur domaine RS (96,98,99). Dans le cytoplasme, la phosphorylation du domaine RS est assurée par les SRPK et favorise l'import nucléaire des protéines SR par leur transportine (156,157). Si les kinases dirigent le recyclage nucléaire des protéines SR, on peut considérer que les phosphatases de leur côté, pourraient promouvoir le transport cytoplasmique de ces protéines quand leurs activités sont requises dans ce compartiment (Figures 6 et 9). Ainsi, la résistance très importante de SRSF2 à la déphosphorylation médiée par les phosphatases explique son incapacité à naviguer entre noyau et cytoplasme (158).

La région RS est considérée comme un domaine NLS puisque sa capacité à être phosphorylée de façon réversible régit la localisation nucléaire des protéines SR (145,159). Contrairement aux protéines SR proprement dites, l'hyper-phosphorylation de la protéine relative à cette famille TRA2 $\beta$  inhibe son interaction avec l'ARN et favorise sa localisation cytoplasmique (160,161). En effet, TRA2 $\beta$  possède plusieurs résidus sérine qui, quand ils sont phosphorylés, inhibent la relocalisation de TRA2 $\beta$  dans le noyau (162). De plus, l'import nucléaire de TRA2 $\beta$  semble pouvoir se faire de façon phosphorylation indépendante (163). La distribution sub-cellulaire de TRA2 $\beta$  est donc régulée de façon différente comparée à la majorité des autres protéines SR.

La phosphorylation des protéines SR, et leur capacité à naviguer entre le noyau et le cytoplasme, résulte en une variation de leur concentration dans ces compartiments cellulaires, qui pourrait concourir à la régulation de l'épissage qui est justement dépendant de la quantité des protéines SR dans le noyau.

Les hnRNP présentent un signal de localisation nucléaire qui leur confère une localisation principalement nucléaire. Les membres des groupes A, B, E, D, I et K peuvent naviguer rapidement entre noyau et cytoplasme grâce un domaine non conventionnel de transport nucléo-cytoplasmique (NS pour nucleo-cytoplasmic shuttling). En immunofluorescence, le signal cytoplasmique des hnRNP est extrêmement faible sauf dans des conditions particulières (comme des cellules en interphase), suggérant que les hnRNP exportées vers le cytoplasme sont rapidement réimportées dans le noyau. Les hnRNP-U et C contiennent seulement le signal de localisation nucléaire et restent donc exclusivement dans le noyau (111). La phosphorylation du domaine NS favorise la localisation cytoplasmique de hnRNP-K et donc son activité inhibitrice sur la traduction de certains transcrits (45,164).

La dynamique de phosphorylation des RBP est aussi modulée par des stimuli externes. Par exemple, en réponse à un stress osmotique, l'activité répressive de hnRNP-A1 sur l'épissage est contrecarrée par un processus d'accumulation de la protéine dans le cytoplasme associé à l'augmentation de sa phosphorylation (165). Un choc thermique induit la déphosphorylation de SRSF10 qui, sous cette forme, réprime fortement l'épissage – cf §1.3.2 (76,79).

- **PARylation**

La **poly ADP-ribosylation** (PARylation) est une PTM qui module aussi l'activité des RBP et elle est médiée par les enzymes de la famille PARP (Poly ADP-ribose polymerase). La PARylation de plusieurs hnRNP a été démontrée, comme celle de hnRNP-A1 et RBMX. Elle inhibe leur capacité de liaison à l'ARN et est impliquée dans le recrutement de certaines RBP aux sites de dommage à l'ADN. En effet, la PARylation est un mode de recrutement connu des DRP sur les sites de dommages, et a aussi été démontré dans le cas de RBMX (166–169). La PARylation de SRSF1 inhibe sa phosphorylation par la Topoisomérase I et il semble que la concentration en motifs PAR sur SRSF1 oriente l'activité de la Topoisomérase I vers le clivage de l'ADN ou/et la phosphorylation de SRSF1 (170). La PARylation des facteurs impliqués dans la réparation des dommages l'ADN n'est donc pas seulement importante pour le recrutement de facteurs sur les extrémités endommagées de l'ADN, mais aussi pour le bon déroulement de l'épissage des pré-ARNm.

Ainsi, les protéines de liaisons à l'ARN forment avec les ARN des complexes dynamiques : les modifications post-traductionnelles apportées à chaque RBP contrôlent la localisation et l'activation de ces protéines, deux critères qui permettent l'action ciblée des RBP sur les ARNm. *In fine*, la régulation extrêmement précise et complexe de l'activité des RBP conditionne le profil d'expression protéique requis par la cellule à chaque instant. Des études récentes ont mis en évidence des rôles nouveaux des RBP dans des processus biologiques différents du métabolisme des ARN. Réciproquement, des protéines connues pour leurs rôles dans d'autres voies ont été identifiées comme actrices du cycle de vie des ARNm. Ces études ont ouvert de nouvelles perspectives vers un élargissement du champ d'action des RBP et notamment, en direction de la réponse aux dommages à l'ADN et des DRP.

## **I.5. Fonctions des RBP dans la réparation de l'ADN**

La cellule est soumise à de nombreux stress, en particulier, des dommages à l'ADN à la suite d'un arrêt de la fourche de réplication de l'ADN, des stress oxydatifs ou d'exposition à des agents génotoxiques. Les RBP interviennent de façon indirecte dans la DDR en modulant l'expression des gènes codant les DRP (DNA repair protein) au niveau post-transcriptionnel. Cependant, des études récentes ont identifié des rôles directs des RBP dans les mécanismes de signalement des sites de dommages à l'ADN (DDS pour DNA Damage Site), leur réparation et de façon plus générale dans le maintien de l'intégrité du génome. De même, l'identification des protéines présentes sur les sites d'épissage, notamment dans certaines conditions de stress, a révélé la présence de DRP, démontrant ainsi que des facteurs connus pour se fixer à l'ARN pouvaient également intervenir au niveau de l'ADN et inversement.

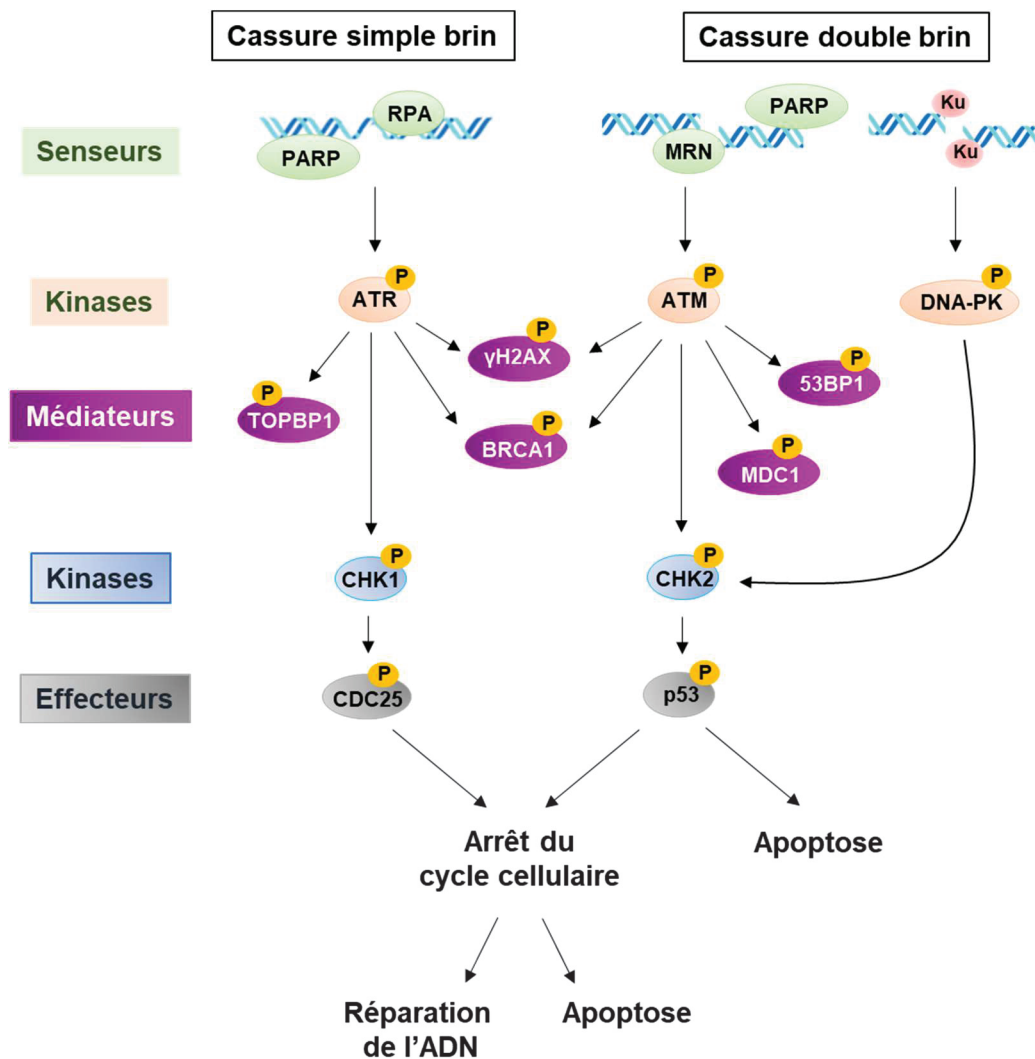
### ***I.5.1. La réponse aux dommages à l'ADN et leur réparation***

Les cellules sont constamment exposées à des stress génotoxiques qui génèrent des cassures de l'ADN : ils surviennent suite aux erreurs des ADN polymérases, lors d'un stress oxydatif, ou suite à l'exposition à des agents chimiques, physiques (radiations) ou infectieux. Les lésions à l'ADN déclenchent une cascade de phosphorylations et autres PTM (PARylation, acétylation, ubiquitination,

SUMOylation...) pour permettre le recrutement et l'activation des DRP sur les DDS. Cette réponse aux dommages à l'ADN a pour fonction de signaler le dommage à la cellule, notamment en bloquant la division cellulaire, de mettre en action sa réparation ou, dans le cas où celle-ci ne peut s'effectuer, d'induire la mort cellulaire par apoptose afin de préserver l'intégrité du génome.

La réponse aux dommages à l'ADN implique, en premier lieu, des senseurs protéiques tels que le complexe MRN (MRE11/RAD50/NBS1), les protéines Ku70/80 ou la protéine RPA (Replication Protein A) reconnaissent les cassures double brin (DSB pour « Double-Stranded Break ») ou simple brin (SSB pour « Single-Stranded Break »), respectivement. PARP peut aussi être recruté au niveau des DSB et des SSB. Ces protéines interagissent ensuite avec l'une des trois kinases majeures qui transduisent le signal du dommage en phosphorylant des médiateurs comme H2AX (un variant de l'histone H2A), BRCA1 ou 53BP1 (Figure 10). La kinase ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) régule un très grand nombre de substrats en réponse aux DSB via MRN (171). ATR (Ataxia Telangiectasia mutated and Rad3-related protein) est plutôt activée par l'intermédiaire de RPA, liée aux SSB (172). ATR est une kinase essentielle à la cellule, contrairement à ATM (173), et multifonctionnelle puisqu'elle peut aussi être activée en réponse à des DSB. Enfin, la DNA-PK forme un complexe avec les protéines Ku70/80 liées aux extrémités des DSB (174). Ces kinases vont amplifier le signalement des lésions notamment en phosphorylant les facteurs H2AX et 53BP1 à proximité des lésions ADN, formant ainsi des *foci* visibles par immunofluorescence.

Les médiateurs participent à l'orientation vers la voie de réparation la plus adaptée à la lésion. Plus en aval, les kinases CHEK1 et 2 sont elles-mêmes phosphorylées, principalement par ATR pour CHEK1 et ATM pour CHEK2, ce qui permet l'activation des effecteurs de la DDR. Les effecteurs déclenchent un ensemble d'évènements qui conduisent à la réparation de l'ADN ou, si les lésions ne peuvent être réparées, à l'apoptose ou la sénescence cellulaire (Figure 10). La nature de la cassure, la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouve la cellule et les protéines impliquées dans la détection du dommage déterminent la voie de réparation mise en jeu. Les dommages simple brin sont réparés par excision de base (BER pour « Base Excision Repair ») ou par excision de nucléotide (NER pour « Nucleotide Excision



**Figure 10. La réponse aux dommages à l'ADN.**

Les cassures d'ADN sont reconnues par des senseurs, RPA et PARP dans le cas des SSB, et MRN, PARP ou les protéines Ku70/80 dans le cas des DSB. Les senseurs activent les kinases ATR, ATM et DNA-PK qui phosphorylent des médiateurs et, plus en aval, les kinases CHEK1 et CHEK2 qui activent les effecteurs de la réponse aux dommages à l'ADN. Ces effecteurs permettent la réparation des lésions, ou si elles sont trop importantes, la mort de la cellule par apoptose ou sénescence (adapté de 173).

Repair » ou MMR pour « Mismatch Repair »). Les dommages double brin sont eux pris en charge par recombinaison homologue (HR) ou par jonction des extrémités (NHEJ – Non Homologous End Joining) (175). Cependant, la réparation des SSB peut aussi conduire à la formation de DSB (comme c'est le cas lors de l'arrêt des fourches de réplication) et donc faire intervenir des réparations par HR ou NHEJ.



La réparation des dommages à l'ADN implique une adaptation de la cellule, avec l'arrêt du cycle cellulaire, ainsi que de multiples modifications notamment au niveau de la chromatine : les histones sont méthylées, phosphorylées comme dans le cas de l'hyper-phosphorylation de H2AX, ou ubiquitinées par exemple par les ubiquitine ligases RNF8 ou RNF168 (176). Ces modifications ont généralement pour conséquence de conduire à un arrêt local de la transcription au niveau de la région d'ADN endommagée. Les protéines PARP participent aussi au remodelage de la chromatine, via leur activité de PARylation consistant en l'ajout des chaînes d'ADP-ribose sur différents histones, contribuant ainsi au recrutement des complexes de réparation au niveau des SSB mais aussi des DSB (177,178). Les dommages à l'ADN entraînent aussi une adaptation de l'expression des facteurs de la DDR et du profil d'expression protéique en général, grâce à l'action des RBP sur le métabolisme des ARN.

### ***1.5.2. Action indirecte des RBP sur la réparation de l'ADN***

La DDR entraîne une modification du profil d'expression des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose, mais aussi de ceux impliqués dans la régulation de l'épissage (179).

Lors d'un stress génotoxique, les RBP sont des cibles majeures de la phosphorylation par ATM et ATR (180,181) qui, de ce fait, interviennent aussi dans la reprogrammation du profil d'épissage. Ainsi, l'activation de la kinase CHEK2 régule l'épissage alternatif de différents transcrits de la DDR mais aussi des transcrits codant pour les RBP elle mêmes. HuR est une RBP impliquée dans la stabilité et la traduction des ARNm et aussi dans l'épissage alternatif des ARNpré-m dans le noyau (182) : HuR phosphorylée interagit avec l'exon 2 de TRA2 $\beta$  pour favoriser son inclusion. Ceci mène à la formation d'un transcrit alternatif qui présente un codon stop prématuré (PTC), donc à la dégradation du transcrit de TRA2 $\beta$  et à une diminution de l'expression de la protéine correspondante. Suite à un stress oxydatif, CHEK2 augmente la phosphorylation de HuR et donc la déplétion en TRA2 $\beta$  (183). En parallèle, les protéines TRA2 $\alpha$  et  $\beta$  permettent la synthèse d'une protéine CHEK1 fonctionnelle à la suite d'un dommage, en régulant l'épissage alternatif du transcrit de CHEK1. La déplétion en protéines TRA2 entraîne donc une diminution de l'expression de CHEK1 et une accumulation de foci  $\gamma$ H2AX (184). L'activité kinase de CHEK2 favorise donc

sa propre voie d'activation en inhibant l'expression des protéines TRA et leur rétrocontrôle positif de l'expression de CHEK1.

Les modifications post-traductionnelles des protéines SR sont importantes pour leur activité d'épissage et sont modulées lors d'un dommage à l'ADN pour permettre une action ciblée sur les gènes des DRP et de la viabilité cellulaire (apoptose, division cellulaire...). Ainsi, la phosphorylation de SRSF1, induite lors de dommages à l'ADN, est associée à un épissage alternatif régulant la survie de la cellule (185). La PARylation, déjà citée dans le recrutement des hnRNP aux sites de dommage, touche aussi SRSF1 et inhibe sa phosphorylation (170). Lors d'un stress génotoxique induit par la cisplatine, SRSF2 est quant à elle hypo-acétylée ce qui favorise sa stabilité et en même temps phosphorylée par SRPK1 et SRPK2 (137).

SRSF10 a été décrite pour son rôle de régulation de l'épissage alternatif de Bcl-x dans le cadre de dommages induits par l'oxaliplatine, un agent anti-cancéreux à action alkylante sur l'ADN. La régulation compétitive des sites d'épissage 5' du transcrite Bcl-x conduit soit au variant Bcl-xL, qui promeut la survie cellulaire, soit au variant Bcl-xS qui est pro-apoptotique (186). La régulation de cet épissage se fait par l'action de nombreuses RBP avec notamment un effet répresseur très fort de hnRNP-K, en amont du site d'épissage de Bcl-x (187), et un effet activateur de l'épissage du complexe hnRNP-F/H en aval (188). Cela résulte en une répression de l'épissage en faveur de la production de Bcl-xL, donc de la survie cellulaire. En conditions normales, les variations de SRSF10 modulent la production de Bcl-xS : une augmentation de SRSF10 phosphorylée favorise son interaction avec hnRNP-K, levant légèrement l'effet répresseur de hnRNP-K sur le complexe hnRNP-F/H qui peut ainsi activer la production du transcrite Bcl-xS (état d'activation mineur). Au contraire, l'absence de SRSF10 favorise la production du transcrite Bcl-xL, puisque hnRNP-K exerce un effet répresseur fort sur le site d'épissage (état de répression majeur). Lors d'un dommage à l'oxaliplatine, SRSF10 est déphosphorylée ce qui abolit l'interaction de SRSF10 et hnRNP-K avec hnRNP-F/H favorisant la production du transcrite pro-apoptotique (189).

Les protéines 14-3-3, interviennent aussi dans ce processus. Ces protéines se lient à des protéines aux fonctions régulatrices très diverses et leur interaction avec les protéines de transduction de signaux se fait par l'intermédiaire d'un résidu phospho-sérine/thréonine (190,191). Les protéines 14-3-3 sont notamment impliquées dans le maintien de SRSF10 dans un état phosphorylé (79). Or, le traitement à

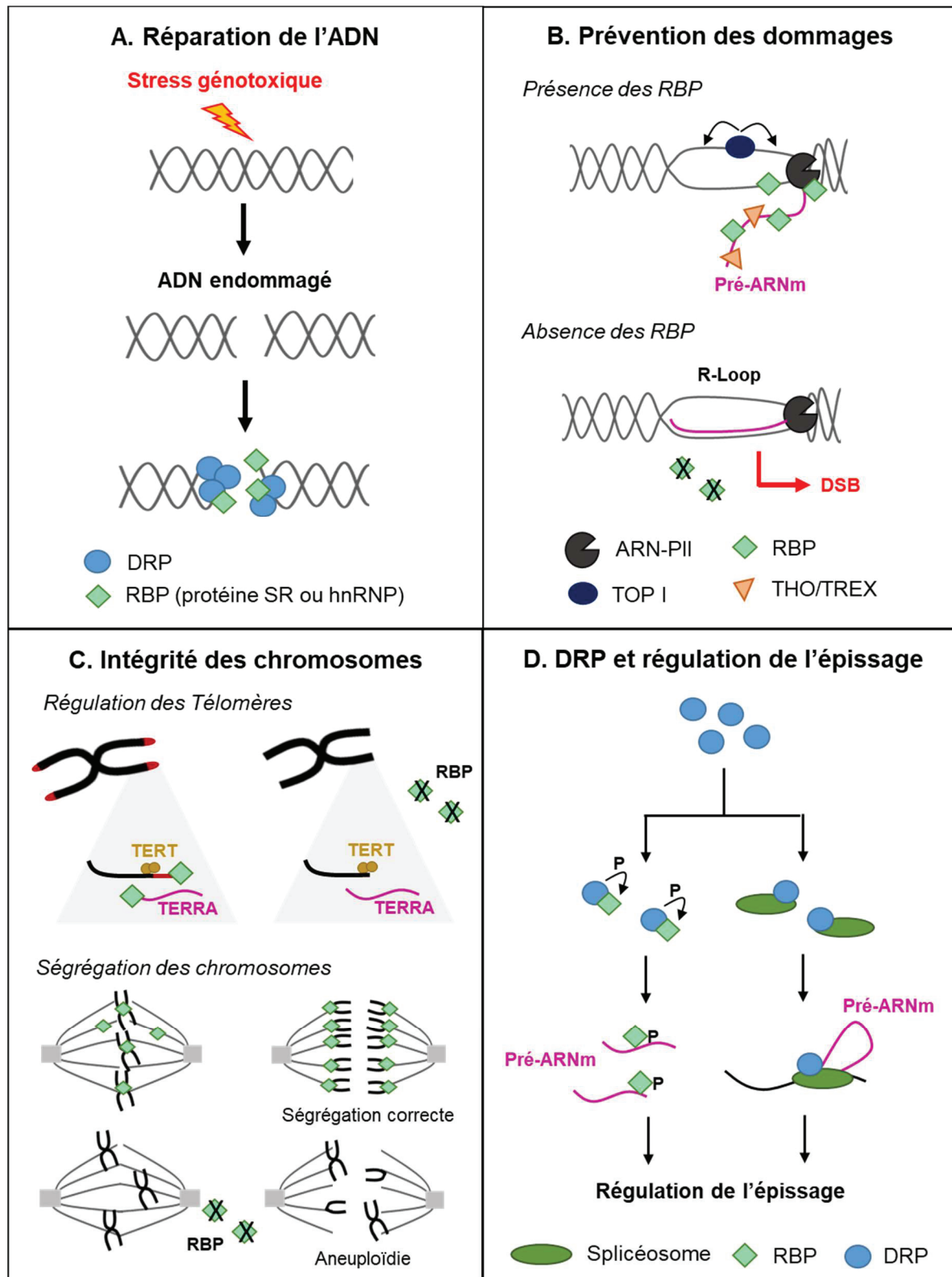
l'oxaliplatine induit la déphosphorylation de SRSF10 grâce à la dissociation des protéines 14-3-3. Les protéines 14-3-3 pourraient donc maintenir SRSF10 dans un état phosphorylé quand elle interagit avec hnRNP-K au niveau des sites d'épissage de Bcl-x. D'autres RBP interviennent aussi dans la régulation de l'épissage de Bcl-x. SRSF1 et RBM10 favorisent ou répriment respectivement la production de Bcl-xL (192,193). Au contraire, RBM11 et PTBP1/hnRNP-I contrecarrent l'effet de SRSF1 sur le transcrit, ce qui favorise la production de Bcl-xS (194,195). Enfin, les protéines hnRNP-A1 et Sam68 sont impliquées dans l'activation de la production de Bcl-xS lors d'un stress génotoxiques (196).

Le rôle des RBP est ainsi crucial dans la détection et la régulation de la réponse aux dommages à l'ADN en modulant l'expression des gènes de la DDR. Mais les RBP interviennent aussi dans les autres étapes du métabolisme des ARNm de la DDR, comme l'élongation des transcrits, ou leur traduction (197). Enfin la DDR module l'action des RBP sur la stabilité des ARNm. Par exemple, hnRNP-A0 et TIAR se fixent à l'ARNm codant pour Gadd45 $\alpha$ , un facteur impliqué dans l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose, pour induire sa dégradation. Quand les cellules sont exposées aux UV, la dissociation de hnRNP-D/AUF1 et TIAR de l'ARNm de Gadd45 $\alpha$  est corrélée à une augmentation de la stabilité de l'ARNm et de l'expression de la protéine correspondante (198).

### ***1.5.3. Action directe des RBP sur la réparation de l'ADN***

Des études récentes ont mis en évidence de nouvelles fonctions des RBP dans le processus de réparation des dommages à l'ADN. Le criblage du génome en condition de stress génotoxiques a révélé la présence des RBP aux DDS, en particulier des hnRNP qui ont une action directe sur la réparation. De plus, la présence des RBP sur les DDS a été corrélée à une réduction de la sensibilité des cellules aux stress génotoxiques (199–201) (Figure 11A).

Les facteurs d'épissage peuvent agir en tant que senseurs des dommages à l'ADN. hnRNP-P2/FUS se fixe aux DSB très rapidement après le dommage et cela de façon PAR-dépendante. FUS permet la phosphorylation de H2AX, l'activation de la DDR et favorise la réparation par HR ou NHEJ (201). De plus, l'activité de FUS dépend de son interaction avec l'histone déacétylase HDAC1, suggérant que FUS pourrait être



**Figure 11. Les rôles non canoniques des RBP et des DRP.**

(A) Les RBP participent activement au processus de réparation des dommages à l'ADN. (B) Les RBP préviennent les dommages induits par une accumulation de R-loops. (C) Les RBP maintiennent l'intégrité génomique et l'euploïdie en prévenant la réduction des télomères et en régulant la ségrégation des chromosomes. (D) Les DRP (DNA Repair Protein) régulent l'épissage des ARNpré-m cellulaires (adapté de 205).

impliqué dans le remodelage de la chromatine, nécessaire au bon déroulement de la réparation des dommages à l'ADN. Ainsi, la mutation du domaine de fixation de FUS à HDAC1 retrouvée dans les cas de poly-mutations du gène FUS associées à la sclérose latérale amyotrophique, entraîne une accumulation de  $\gamma$ H2AX et un défaut de réparation de l'ADN (203,204).

De nombreuses RBP retrouvées aux DDS semblent être recrutées de façon PAR-dépendante (205). C'est le cas de FUS (201), mais aussi de NONO (20), RBM14 (206) et RBMX (169). Il est possible que ce type de recrutement participe au détournement de certaines RBP des sites d'épissage vers les DDS. Le recrutement de certaines RBP aux sites de cassures aurait aussi une conséquence fonctionnelle en termes de réparation : NONO agit en complexe avec SFPQ pour stabiliser les extrémités des DSB et favoriser la réparation par NHEJ au détriment de la HR (20,207). Le recrutement de RBM14 oriente la réparation par NHEJ : il interagit avec

Ku80, favorise la libération du complexe Ku80/ Ku70 de l'ADN et il active l'autophosphorylation de la DNA-PK. RBM14 est aussi nécessaire au recrutement des facteurs XRCC4 et XLF et à la libération des protéines Ku (206,208). RBMX s'accumule aux DDS de façon PAR-dépendante, et active la réparation par HR. Cependant, la déplétion de PARP1 entraîne un défaut d'accumulation de RBMX aux DDS qui ne modifie pas l'efficacité de réparation par HR. Il semblerait que RBMX active la HR de façon indépendante à la PARylation, en augmentant l'expression de BRCA2 (169). Le mécanisme d'action de RBMX aux DDS reste donc à préciser. Une étude antérieure suggère que RBMX serait nécessaire à la fidélité de réparation des extrémités endommagées (EJ pour « End joining fidelity ») en empêchant une résection trop importante des brins d'ADN endommagés (209). RBMX pourrait donc servir à la protection des extrémités d'ADN endommagées, contre l'attaque d'exonucléases. Sa fixation aux motifs PAR pourrait aussi assurer une structure adéquate de l'ADN pour faciliter sa réparation.

Les protéines citées sont toutes des composants des Paraspeckles le corps nucléaire impliqué dans la rétention d'ARNm et/ou de protéines (cf §I.4.1). Ainsi, l'intervention d'un certain nombre de protéines des Paraspeckles dans le processus de réparation de l'ADN conforte l'hypothèse d'un rôle de ce corps nucléaire dans le stockage de facteurs protéiques, qui seraient libérés en cas de besoin (19). L'action

directe des RBP dans la réponse aux dommages à l'ADN dépend d'un recrutement rapide, et participe à la mise en place d'une réparation adéquate des lésions.

#### ***1.5.4. RBP et intégrité génomique***

Au-delà de la détection et de la réparation des lésions de l'ADN, le maintien d'un génome stable passe par la gestion des défauts du métabolisme de l'ARN, la régulation des télomères, de la réplication des chromosomes et de leur ségrégation. Différentes études ont identifié un rôle crucial des RBP dans ces processus.

- **Prévention des R-loops**

Les R-loops sont des structures contenant des hybrides ARN-ADN, plus stables que l'ADN double brin. Elles peuvent se former notamment durant la transcription, quand le transcrit naissant s'hybride à la séquence ADN qui lui sert de matrice. Les R-loops sont naturellement retrouvées *in vivo* et représentent plus de 5% du génome humain (210). Elles sont impliquées dans la terminaison de la transcription, la réplication de l'ADN mitochondrial, la commutation de classe des immunoglobulines et des modifications de la chromatine. Elles sont détruites par des enzymes comme la RNase H ou des hélicases quand leur action est terminée. Cependant, une production excessive ou un défaut d'élimination des R-loops représentent une menace à l'intégrité du génome (211). Des protéines sont donc impliquées dans la prévention de la formation des R-loops, comme l'ADN Topoisomérase I, le complexe d'export des ARNm THO/TREX ou les RBP. En particulier, les protéines SRSF1, 2 et 3 interviennent dans ce processus. Le mécanisme primaire ferait intervenir la capacité des RBP à se fixer en de multiples points de la molécule d'ARN en empêchant ainsi son hybridation avec le brin d'ADN (Figure 11B). Un défaut de leur expression entraîne une accumulation de R-loops et la mise en route de mécanismes de réparation conduisant à la formation de DSB et à un phénotype d'hyper-mutation (212,213). Le recrutement des protéines SR par l'ARN-PII dès le début de la traduction pourrait aussi participer à la prévention de la formation de ces hybrides ADN/ARN et donc des DSB. Les hnRNP ont été impliquées dans ce mécanisme de prévention chez la levure où l'absence de Npl3, la plus abondante hnRNP, entraîne une accumulation de R-loops (214).

- **Régulation des télomères**

La régulation de la longueur des télomères, qui correspondent aux extrémités des chromosomes, est un autre aspect primordial du maintien de l'intégrité chromosomique. Une réduction excessive des télomères inhibe la division cellulaire, augmente la senescence et affecte la progression tumorale (215–217). Les télomères sont formés par des répétitions de la séquence TTAGGG, générées grâce au complexe TERT (Telomerase Reverse Transcriptase). Les télomères se terminent en un simple brin formant une boucle appelée T-loop, et présentent une structure propice à l'activation de la DDR. Ils sont transcrits en un ARN non codant TERRA, dont les fonctions ne sont pas complètement connues, mais qui pourrait participer à structurer les protéines agissant sur les télomères. Le complexe protéique Shelterin protège les télomères et il est déterminant pour la prévention d'une activation aberrante de la DDR. Des facteurs de réparation, comme le complexe MRN, sont aussi présents à proximité des extrémités des chromosomes (218,219). Les RBP, en particulier hnRNP-A1, C, D, F, H, U et FUS, participent à la stabilité génomique en régulant les télomères. Elles modulent l'association des composants du complexe protéique télomérique, la localisation de l'ARNnc TERRA, se lie à TERT, et bien sûr, régulent l'expression des gènes codant pour des facteurs de régulation des télomères (211). Par exemple, FUS interagit avec les structures G-quadruplex, formées par les extrémités d'ADN et l'ARN non codant TERRA, et régule la modification des histones télomériques (220,221) (Figure 11C).

- **Cohésion des chromosomes**

Les défauts de réplication et ségrégation des chromosomes représentent aussi un facteur d'instabilité génomique. De façon intéressante, une étude des gènes impliqués dans la division cellulaire a révélé l'importance de facteurs d'épissage dont la déplétion entraîne des anomalies de mitose (222). Ainsi, l'inhibition de hnRNP-U entraîne un défaut de recrutement de la kinase Aurora A nécessaire à la mise en place du fuseau mitotique (223). Les facteurs d'épissage sont aussi impliqués dans la régulation de la cohésion des chromatides. La cohésion des chromatides sœurs sur toute leur longueur, assurée par un complexe de cohésines (Scc1 et 3, Smc1 et 3), est nécessaire jusqu'à la métaphase, puis se limite à la région centromérique pour assurer l'alignement des chromosomes avant la mitose. RBMX est impliquée dans la

cohésion du centrosome nécessaire à cet alignement des chromosomes. RBMX est essentielle à la localisation des régulateurs de la cohésion Sgo1 et PP2A au centrosome : la perte des cohésines au niveau du centrosome induite par la déplétion de RBMX entraîne une séparation précoce des chromatides sœurs. Wapl est une protéine qui interagit avec la chromatine et régule la dissociation des cohésines de la chromatine durant le cycle cellulaire (224,225). Il semble que RBMX antagonise l'activité de Wapl, ce qui maintient la cohésion des chromatides sœurs avant leur séparation durant la mitose (226) (Figure 11C).

Les RBP, et en particulier les protéines SR et hnRNP, en plus de leurs fonctions de régulateurs de l'expression des gènes dans de multiples contextes, assurent donc des fonctions diversifiées dans le maintien de l'intégrité génomique. De même, des protéines impliquées dans des voies biologiques telles que la réparation de l'ADN peuvent elles aussi agir de façon non canonique sur le profil d'expression des gènes cellulaires.

## **I.6. Identification de nouvelles RBP**

Les études de protéomiques ont permis d'identifier des protéines associées au métabolisme des ARNm différentes des RBP conventionnelles. Ces nouvelles RBP ont pour la plupart des fonctions déjà connues (enzymes, kinases, DRP, protéines associées à la chromatine...). Certaines agissent de façon indirecte en stimulant l'activité de RBP connues, mais d'autres sont capables de se fixer aux ARN. Ces dernières, qui ne possèdent pas de domaine de liaison à l'ARN conventionnel, ont permis d'identifier de nouveaux modes de reconnaissance des ARN (Figure 11D).

Les DRP, en particulier les kinases ATM, ATR et, plus en aval, CHEK1 et CHEK2, n'agissent pas uniquement sur les protéines de la DDR mais aussi sur des facteurs d'épissage pour moduler ce processus, y compris en l'absence de dommage à l'ADN. Ainsi, CHEK2 interagit avec CDK11<sup>p110</sup>, un régulateur clé de l'épissage et de la transcription et le phosphoryle en dehors d'un contexte de dommage à l'ADN. La déplétion de CHEK2 entraîne donc un défaut de phosphorylation de CDK11<sup>p110</sup> et de son homodimérisation avec comme conséquence une diminution de son activité



d'épissage endogène (227). En cas de stress génotoxique, l'activation de CHEK2 régule l'épissage du transcrit Bcl-x dans le contexte de cancer (228), et phosphoryle HuR qui régule l'épissage de TRA2 $\beta$  comme explicité précédemment - cf §1.5.2 (183).

Certaines DRP interviennent de façon directe dans le métabolisme des ARN en modulant l'épissage. La PDIP38 (polymerase delta interacting protein 38), qui intervient dans la synthèse d'ADN suite à une lésion, est relocalisée dans les Speckles suite à l'exposition aux UV et module l'épissage alternatif de MDM2, impliqué la régulation de p53 et donc du cycle cellulaire et de l'apoptose (229). Lorsqu'il est phosphorylé à la suite d'un dommage, BRCA1 interagit avec des facteurs d'épissage tels que PRP8 ou U2AF35 et se localise au niveau des promoteurs des gènes impliqués dans la DDR. P-BRCA1 permet ainsi le recrutement du spliceosome et des facteurs nécessaires à l'expression des gènes induits par un stress génotoxique (230). De plus, le complexe BRCA1/BARD1 a une activité ubiquitine ligase qui est mise en jeu lors de dommages à l'ADN : ce complexe cible l'ARN-PII et favorise sa dégradation, inhibant de cette façon le clivage en 3' nécessaire à la maturation des ARNm (231).

Des protéines de voies biologiques complètement différentes peuvent aussi interagir directement avec les ARN et réguler leur métabolisme. Les enzymes de la glycolyse ont la capacité de se lier aux ARN et, pour certains d'entre eux, aux transcrits codant pour les enzymes glycolytiques. La GAPDH (Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase) participe au contrôle de la traduction des ARNm des cellules myéloïdes, et il semble que son domaine de liaison aux di-nucléotides soit impliqué dans la fixation aux éléments riches en AU des ARN (232,233). Les cyclines régulent le cycle cellulaire en activant les kinases cycline-dépendantes (cdk) et sont un autre exemple de RBP non conventionnelles. Chez les souris, l'absence de cycline A1 module l'expression de Mre11, ce qui a été mise en cause dans la formation de tumeur. La cycline A1 se lie directement à la région 3' du transcrit de Mre11 et favorise sa traduction. C'est le domaine de liaison aux CDK, qui interagit aussi avec le facteur de traduction eIF4A2 suggérant que la cycline A1 favoriserait l'expression de Mre11 en activant sa traduction (234). De nombreuses autres protéines interviennent dans la régulation des transcrits, comme des enzymes mitochondriales, des protéines de choc thermique, des histones et autres protéines associées à la chromatine.

Il est possible que le changement de fonction de ces protéines soit médié par leur interaction avec les ARNm, faisant de ces derniers des acteurs dans la diversité fonctionnelle des protéines cellulaires (235,236). Cette piste est d'ailleurs étayée par le fait que les nombreuses RBP non canoniques ne présentent que rarement un domaine de liaison aux ARN, mais que leurs ARN cibles présentent des structures secondaires particulières qui permettent le recrutement de ces protéines (237). Les transcrits de nombreux virus exploitent ce mécanisme : chez les Picornavirus, le virus de l'hépatite C et le virus HSV-1, par exemple, les structures secondaires des ARNm viraux comme les IRES permettent l'initiation de la traduction indépendamment de la coiffe. Les IRES fixent et stabilisent les facteurs de traduction, ou directement les sous-unités ribosomiques et peuvent ainsi se passer de l'action des facteurs d'initiation de la traduction conventionnels. De façon plus générale, les virus ont développé de nombreuses stratégies pour détourner la machinerie du métabolisme des ARNm à leur avantage.

## I.7. RBP et Virus

Les virus interagissent avec les protéines de liaison aux ARN et/ou détournent leurs fonctions dans le but d'optimiser l'expression de leurs gènes et de favoriser leur réplication. Ils préviennent ou facilitent la mise en place du spliceosome sur des sites spécifiques et les transcrits viraux présentent des éléments *cis*-régulateurs forts. Les virus exploitent aussi l'interconnexion entre épissage et stabilité des ARN pour éviter à leurs ARN d'être dégradés. Ils détournent aussi la machinerie d'export des ARN pour favoriser leurs propres transcrits. Les virus mettent ainsi en place des stratégies très différentes en fonction des spécificités de leurs ARN. Par exemple, parmi les sept transcrits d'HIV-1, six nécessitent des événements d'épissage alternatif. A l'inverse, le virus à ADN HSV-1 produit plus de 80 transcrits dont cinq seulement sont épissés (238). Ces deux virus sont donc confrontés à des problèmes différents qui ont requis la mise en place des stratégies de contournement des fonctions des RBP spécifiques.

Une infection virale induit de nombreux bouleversements dans la cellule, à commencer par des changements quantitatifs et qualitatifs de nombreuses protéines cellulaires dont des RBP. Ainsi, les quantités en protéine SRSF2 augmentent puis diminuent au cours de l'infection par HIV-1 (239). L'infection par HPV-16 (Human

Papillomavirus 16 – virus à ADN double brin) augmente l'expression de SRSF1 et de son antagoniste hnRNP-A1 dans le but d'adapter l'action de ces protéines à la réplication virale (240). D'une façon générale, les virus modulent la phosphorylation des protéines SR ce qui modifie leur localisation et leur activité. L'effet des infections virales sur les hnRNP a été en revanche moins étudié.

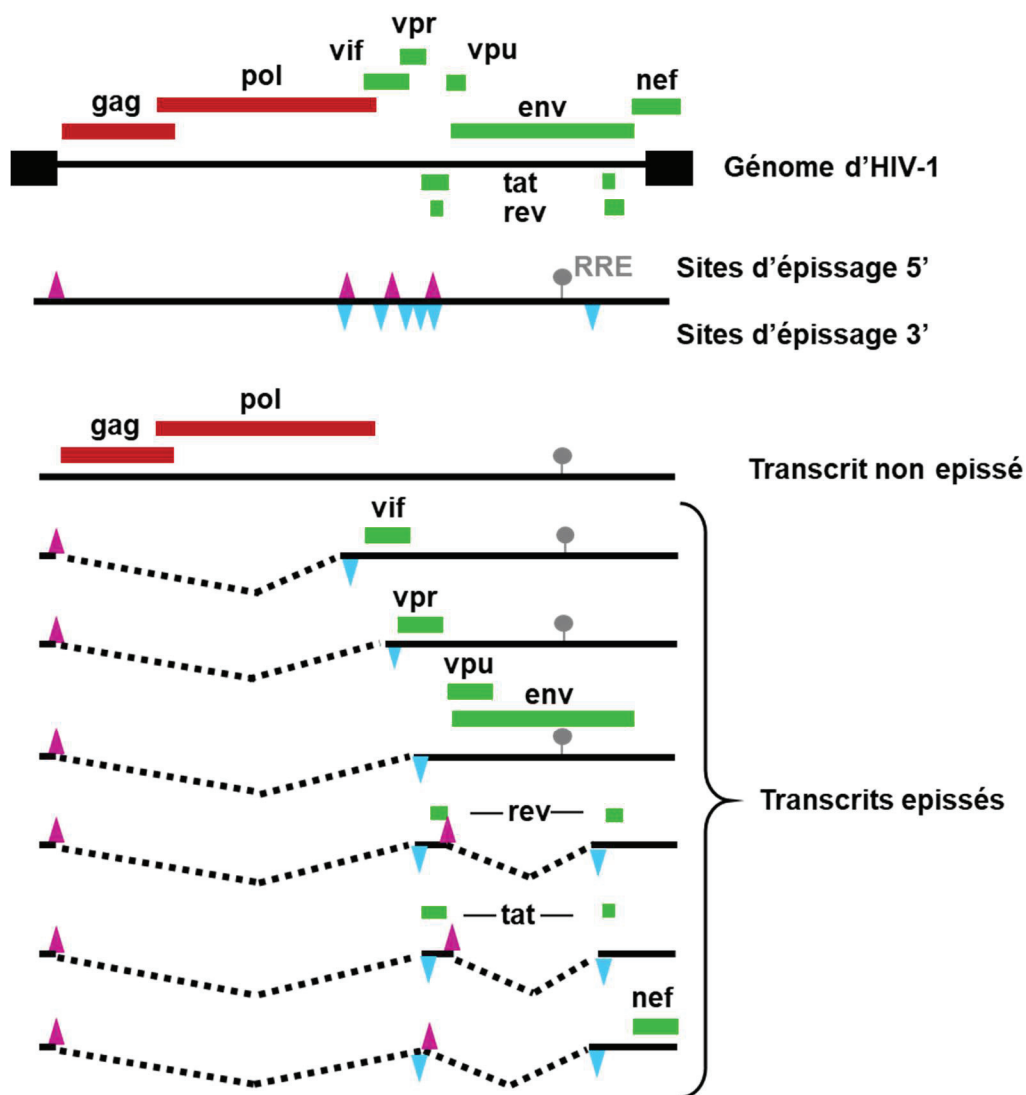
### ***1.6.1. Rôle des RBP dans le métabolisme des ARN viraux***

- **Lentivirus : l'exemple de HIV-1**

Le génome des lentivirus est un ARN simple brin de polarité positive reverse transcrit en un ADN double brin qui est ensuite intégré au génome de l'hôte. HIV-1 est l'un des lentivirus les plus connus pour l'utilisation des mécanismes d'épissage alternatif. Plusieurs sites d'épissage en 5' et en 3' sont à l'origine d'une variété importante d'ARNm qui permettent, à partir d'une génome compact, la synthèse de trois protéines structurales Gag, Pol et Env, des protéines régulatrices Tat (qui stimule la transcription virale) et Rev (qui permet le transport des ARN viraux dans le cytoplasme) et des protéines accessoires Vpu, Vif, Vpr et Nef (242). Certains de ces ARNm sont épissés et d'autres non, mais tous doivent être efficacement exportés pour la synthèse des protéines et la formation des virions. Ainsi, la régulation des événements d'épissage et d'export est cruciale pour la réplication d'HIV. Elle se fait grâce aux séquences *cis*-régulatrices virales (Figure 12) et aux protéines du métabolisme des ARN telles que les protéines SR et hnRNP (243). La réplication d'HIV-1 est particulièrement sensible aux variations même minimales des facteurs d'épissage, ce virus doit donc assurer une régulation très précise de ces facteurs.

Les sites d'épissages en 5' d'HIV-1 sont définis comme forts, alors que ceux en 3' sont plutôt faibles. De plus, les exons viraux présentent des ESE et ESS sur lesquels se fixent et agissent des hnRNP et des protéines SR. Des études ont montré que les protéines hnRNP-A/B et hnRNP-A1 ont une forte affinité pour les ESS d'HIV et inhibent l'épissage (244,245). A l'inverse, SRSF1 et 2 se lient aux ESE et activent l'épissage de l'exon 3 de Tat. Lorsque hnRNP-A1 se fixe à l'ESS de cet exon, son fort pouvoir inhibiteur l'emporte et favorise l'inhibition de l'épissage mais cet effet peut être contrecarré par une surexpression de SRSF1 (70,246). Par ailleurs, Tat interagit avec des cofacteurs de SRSF1 ce qui prévient la phosphorylation de SRSF1 et inhibe son

activité d'épissage, favorisant la génération de long transcrit viraux non épissés. En effet, une forte activation de l'épissage due à SRSF1 peut être délétère pour HIV-1 puisque cela réduit la production des protéines structurales produites à partir des ARNm non épissés (247–249). L'importance des sites de régulation de l'épissage d'HIV a été mise en évidence par une mutation unique qui entraîne l'activation de l'inclusion de l'exon 6D : la mutation provoque la disparition d'un ESS et permet le



**Figure 12. Éléments *cis*-régulateurs et épissage d'HIV-1.**

Le génome d'HIV-1 (ligne noire) comporte deux séquences LTR (séquences Long Terminal Repeat) répétées à ses extrémités (rectangles noirs), et 9 ORF. 7 transcrits sont produits grâce à au moins 4 sites d'épissage en 5' (triangles roses) et 8 en 3' (triangles bleus). L'ARN non épissé est traduit en les protéines Gag et Pol (en rouge). Cet ARN peut être épissé pour donner les protéines Vif, Vpr, Vpu, Env, Rev, Tat et Nef (en vert). La région RRE (Rev Responsive Element) permet l'export nucléaire des transcrits qui la comporte (adapté de 248).

recrutement de SRSF1 et 2 et de l'hnRNP-H, ce qui a pour conséquence l'activation de l'épissage de l'exon et la production de transcrits aberrants. La production des transcrits non épissés d'HIV-1 est alors fortement réduite, ainsi que celle des transcrits épissés codant Tat, Rev, Env, Vpu et Nef, conduisant à une inhibition de la réplication virale (251,252).

Beaucoup d'études se sont penchées sur le rôle des protéines SR et de leur état de phosphorylation sur l'épissage alternatif des ARN d'HIV-1. Ainsi, l'usage de molécules ciblant spécifiquement certaines CLK a montré l'importance de ces kinases pour la production des transcrits viraux épissés ou non et la synthèse des protéines virales (253). Parmi les molécules ciblant les CLK, la digoxine potentialise l'effet délétère de SRSF3 sur la production des ARNm viraux codant les protéines structurales d'HIV-1, diminuant ainsi drastiquement la réplication du virus (254). Les molécules de type indol tetracyclique ont montré leur efficacité pour inhiber les sites d'épissages ESE d'HIV-1 en interagissant directement avec les protéines SR (255). Une étude plus poussée sur le dérivé IDC16 a montré une action sur SRSF1 entraînant une inhibition de la réplication virale dans des lignées de macrophages et de lymphocytes T (256). Une librairie de dérivés d'IDC16 présentant des propriétés anti-virales a été générée. Parmi ces dérivés, la molécule 1C8 a été identifiée comme la plus active et avec une faible toxicité cellulaire (257). Les tests de son activité sur HIV-1 ont révélé une action sur la protéine SRSF10 : 1C8 favorise la déphosphorylation de SRSF10 ce qui augmente son interaction avec TRA2 $\beta$ , un régulateur connu de l'épissage d'HIV (258), et diminue celle avec hnRNP-F (259). Les modifications induites par 1C8 ont pour conséquence une diminution de la réplication d'HIV-1. 1C8 réduit l'association de SRSF10 aux ARNm d'HIV-1, diminue l'accumulation des ARN viraux, notamment celle des transcrits épissés codant pour Vpr1, Nef et Tat1 mais pas de celui codant pour Rev. De plus, 1C8 diminue l'accumulation des transcrits viraux non épissés dans le cytoplasme, ce qui pourrait être dû à un défaut de transport entraîné par une modulation de l'expression ou de la localisation de Rev, ou à une dégradation cytoplasmique des ARNm viraux. La déplétion en SRSF10 ne contrecarrant pas tous les effets de 1C8, il est possible que cette molécule agisse aussi sur d'autres facteurs d'épissage (259).

D'autres protéines SR telles que SRSF4, 5 et 6 ont un rôle d'activation de l'épissage des ARN d'HIV-1 (260). Certaines d'entre elles, comme SRSF5 et 6,

favorisent aussi la traduction des transcrits non épissés en activant leur export avant qu'ils ne soient épissés (261). Les RBP participent donc aussi, avec la protéine virale Rev, à la régulation de l'export des transcrits viraux (262,263). C'est un point critique de la réplication virale, puisque le système de transport nucléo-cytoplasmique de la cellule prend préférentiellement en charge les ARNm épissés, qui sont majoritaires parmi les ARNm cellulaires. Les ARN non épissés d'HIV-1 et d'autres retrovirus présentent des structures particulières (RRE - Rev-Responsive Elements ; des structures en tige/boucle) qui permettent le recrutement des protéines d'export (264–266). Tout comme les ARN cellulaires, l'association des RBP avec leur ARN cible durant la transcription et l'épissage pourrait se prolonger en vue de participer à la régulation de l'export de ces transcrits.

- **Virus à ADN : le Virus Herpes Simplex de type 1**

Le génome d'HSV-1 est composé d'une molécule d'ADN double brin linéaire d'environ 152 Kpb. La majorité des transcrits d'HSV-1 ne sont pas épissés. Cela implique que le virus a développé des stratégies spécifiques pour l'export de la majorité de ses ARN en l'absence d'une étape d'épissage. De plus, l'infection par HSV-1 perturbe fortement le métabolisme cellulaire en induisant une dégradation des ARNm cellulaires et une diminution drastique de leur traduction, qui serait spécifiquement induite par la protéine virale Vhs (viral host shut-off protein) (267).

La protéine virale ICP27 est une protéine clef d'HSV-1 impliquée dans la régulation de la biogenèse du transport des ARNm viraux. Elle entraîne une redistribution des snRNP et de nombreux facteurs d'épissage. En particulier, ICP27 induit la relocalisation de certaines protéines SR des Speckles vers le cytoplasme. Il semble que lors de cette relocalisation, les protéines SR participent à l'export des ARNm viraux non épissés. En effet, ICP27 permet le maintien des protéines SR dans un état hypo-phosphorylé favorable à leur association avec le facteur d'export TAP/NXF1. Ainsi, SRSF3 et 7, qui colocalisent avec ICP27, permettent un export efficace des ARNm viraux (268). De plus ICP27 interagit lui-même avec TAP/NXF1 ainsi qu'avec la protéine adaptatrice Aly/Ref pour permettre l'export des transcrits viraux (269).

De façon intéressante, ICP27 interagit avec la kinase SRPK1 et pourrait ainsi moduler la phosphorylation des protéines SR dans le noyau (270). ICP27 interagit

aussi avec hnRNP-K et induit une phosphorylation non conventionnelle de cette hnRNP par la kinase CK2 (Casein Kinase 2) suggérant que, par ce biais, ICP27 pourrait détourner les fonctions d'hnRNP-K (271,272). Bien qu'hnRNP-K navigue entre le noyau et le cytoplasme, son rôle dans l'export des ARNm viraux comme cellulaires reste à démontrer.

De façon plus générale, les autres membres de la famille des *Herpesviridae* utilisent les protéines SR au profit de la synthèse de leurs transcrits. La protéine SM d'EBV (Epstein Barr Virus) interagit avec SRSF3, hnRNP-C1/C2 et hnRNP-A1/A2 pour permettre la production du transcrit de l'ADN polymérase virale (273,274). Chez KSHV (Kaposi's Sarcoma-associated HerpesVirus), la protéine ORF57, qui est l'homologue d'ICP27, se localise dans les Speckles et recrute SRSF2/SC35 au niveau des ARNm viraux pour favoriser leur métabolisme (275). De plus ORF57 interagit avec SRSF3 pour contrer son action répressive sur l'épissage des transcrits viraux (276).

### **1.6.2. Les protéines virales RBP-like**

Les virus utilisent donc les RBP pour réguler le métabolisme de leur ARN. Mais, certaines protéines virales elles-mêmes possèdent des homologies avec les RBP, en particulier avec les protéines SR. Ces protéines virales présentent en effet des domaines identiques ou variant légèrement par rapport aux domaines RS. Ceci permet aux protéines virales RBP-like d'agir directement, ou indirectement *via* les protéines SR, sur l'expression des gènes viraux.

La protéine E2 d'HPV régule la transcription en se liant à certains promoteurs viraux et participe à la réplication de l'ADN viral (277). Elle est composée d'un domaine de transactivation en position N-terminale et d'un domaine de liaison à l'ADN en position C-terminale, qui sont séparés par un domaine charnière de longueur variable en fonction des génotypes d'HPV. Dans les formes longues d'E2, comme chez l'HPV-5, on trouve des répétitions de dipeptides RS, suggérant un rôle d'E2 dans le métabolisme des ARN. En effet, E2 interagit avec nombreuses protéines SR (SRSF1, 2, 3, 4, 5, et 6) et des snRNP contenant des domaines RS. Des études fonctionnelles ont montré l'implication d'E2 dans la promotion de l'épissage des transcrits transactivés par E2 lui-même (278). Des études plus récentes ont aussi montré qu'E2 peut réprimer la transcription virale en recrutant des facteurs de régulation de la chromatine (279,280).

Ce type de protéine virale est aussi retrouvé dans des virus tout à fait différents, comme chez le Coronavirus qui est un virus à ARN simple brin de polarité positive. La protéine de la nucléocapside N, qui est la plus abondante durant la réplication virale, joue de multiples rôles dans la transcription, la réplication et l'encapsidation du génome viral (281). Les domaines N- et C-terminaux de N sont impliqués dans sa liaison aux acides nucléiques et dans l'oligomérisation de la protéine (282,283). Les nucléocapsides de ce virus sont très différentes selon les espèces infectées, mais elles contiennent toutes une séquence riche en RS dans leur région centrale, qui peut être poly-phosphorylée. Les kinases de types CK2, CDK, et SRPK peuvent notamment phosphoryler la protéine N. Comme les facteurs SR, la protéine N peut être relocalisée dans les granules de stress à la suite d'un stress environnemental. Cette migration semble dépendante de son état de phosphorylation puisque la surexpression de SRPK1 empêche sa relocalisation. D'un point de vue fonctionnel, il semble que la phosphorylation de N module ses fonctions de reconnaissance préférentielle des ARN viraux et de suppression de la traduction des ARN de la cellule hôte (284,285).

Une autre protéine de capsid virale est connue pour posséder des domaines SR-like : la protéine Core du virus de l'Hépatite B (cf § II.2.4). Ses fonctions sont modulées par la phosphorylation, notamment lors de l'encapsidation de l'ARN pré-génomique et de la maturation de la capsid (286,287). Au contraire des deux protéines virales précédentes, c'est le domaine C-terminal de Core qui compte plusieurs dipeptides RS non consécutifs, ainsi que des répétitions SPRRR. Ce sont ces dernières qui semblent principalement phosphorylées (288) par des kinases dont 3 ont été identifiées pour cette action sur Core : SRPK1, 2 et PLK1 (289–291). La phosphorylation de Core par les kinases de la famille SRPK est un autre point commun entre Core et les protéines de la famille SR. La protéine Core du virus de l'hépatite B infectant le canard (DHBV – Duck Hepatitis B Virus) présente plusieurs répétitions RS, et leur phosphorylation est requise pour la synthèse du brin d'ADN négatif lors de la reverse transcription (cf §II.3.3 pour le virus humain) (292). Si l'état de phosphorylation de Core semble déterminant pour l'encapsidation et la reverse-transcription du génome viral, il reste à déterminer si ces domaines SR-like de Core peuvent intervenir dans des interactions avec des protéines de liaisons aux ARN et donc si Core intervient dans le métabolisme des ARNm viraux ou cellulaires lors de l'infection par HBV.

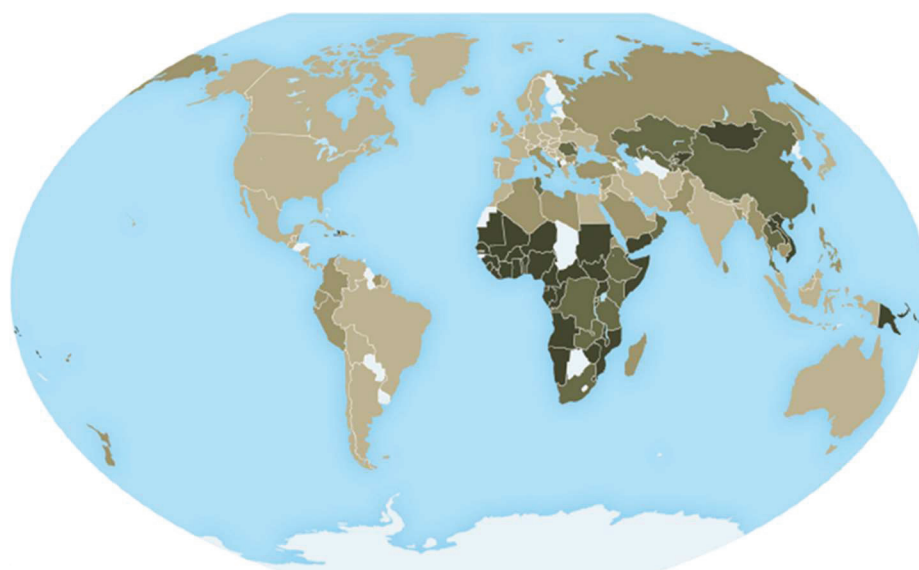


## II. Le Virus de l'Hépatite B

### II.1. Généralités

#### II.1.1. Prévalence et modes de transmission

Le virus de l'Hépatite B infecte chroniquement environ 257 millions de personnes dans le monde. Les porteurs présentent un risque accru de développer des complications telles que la cirrhose et le CHC (Carcinome hépatocellulaire). Ainsi, chaque année, les infections aiguës et chroniques à HBV sont responsables de plus de 800 000 décès (293). La séroprévalence d'HBV, représentée par les porteurs de l'antigène HBs (HBsAg), concerne 3,61% de la population mondiale. Ce taux varie en fonction des régions, pouvant atteindre 8% de la population dans certaines régions d'Asie et d'Afrique (294,295) (Figure 13).



#### Prévalence de l'hépatite B

- Forte :  $\geq 8\%$
- Intermédiaire forte : 5 - 7,9 %
- Intermédiaire faible : 2 - 4,9 %
- Faible :  $< 2\%$
- Non déterminée

**Figure 13. Séroprévalence mondiale de l'hépatite B.**

La séroprévalence de l'hépatite B est définie par le pourcentage de personnes infectées par HBV, selon quatre groupes : séroprévalence faible ( $< 2\%$ ), intermédiaire faible (2-4,9%), intermédiaire forte (5-7,9%), forte ( $\geq 8\%$ ) (adapté de 295).

Chez les personnes infectées de façon chronique et productive, le virus est présent dans la plupart des fluides biologiques : le sang, le sperme, les sécrétions vaginales, le lait maternel et la salive... (296,297). La transmission verticale d'HBV, de la mère à l'enfant, représente un des modes de contamination le plus courant dans les régions endémiques : la transmission a majoritairement lieu en périnatal lors de l'accouchement, et très faiblement *in utero* ou en post-natal lors de l'allaitement (298). Les transmissions horizontales ont lieu principalement par contact parentéral avec du sang contaminé (transfusion, aiguilles contaminées) ou par contact sexuel avec échange de fluides (296).

### II.1.2. Génotypes

HBV compte 8 génotypes majeurs (A-H), caractérisés par une variabilité nucléotidique supérieure à 7,5%, et une distribution géographique spécifique : les génotypes majeurs présents en Europe sont les A et D, alors qu'en Chine les génotypes B et C sont les plus répandus (Figure 14). Deux génotypes additionnels ont été proposés, I et J, mais ils ne sont pas encore reconnus par le comité international de taxonomie des virus. Le taux d'évolution vers une infection chronique, la



**Figure 14. Distribution géographique des différents génotypes d'HBV.**

Le virus de l'hépatite B compte 8 génotypes de A à H dont la prévalence est répartie différemment selon les continents (adapté de 299).

pathogénicité liée à l'infection ainsi que le pronostic clinique varient en fonctions des génotypes. Par exemple, le génotype C a été associé à un plus haut niveau de réplication virale, des lésions hépatiques plus sévères et à une résistance plus importante aux traitements par interféron et aux analogues de nucléosides, par rapport au génotype B. Le passage à la chronicité est par ailleurs plus élevé pour les génotypes A et D que les B et C (299).

### II.1.3. Tropisme et pathologie

Le virus de l'Hépatite B a un tropisme principalement hépatocytaire et effectue un cycle réplcatif productif exclusivement dans ces cellules. Néanmoins, il a été retrouvé en petites quantités dans le pancréas, le rein, la peau, les spermatozoïdes, la moelle osseuse et les cellules mononuclées du sang (PBMC), principalement les monocytes et les lymphocytes B (300–302). Si l'infection dans ces compartiments n'est pas productive, elle pourrait toutefois être impliquée dans la modulation de la réponse immunitaire lors de l'infection par HBV. Elle pourrait aussi constituer un réservoir pour la persistance occulte du virus (303,304).

L'infection aiguë par HBV est le plus souvent asymptomatique (60 à 80 % des cas), mais peut dans moins de 1% des cas engendrer une forme mortelle d'insuffisance hépatique, l'hépatite fulminante. Après l'infection aiguë, 90% des nourrissons développent une hépatite B chronique, alors que ce pourcentage tombe en dessous de 10% chez les adultes immunocompétents.

L'hépatite B chronique se caractérise par la persistance de l'antigène viral HBs (HBsAg) pendant plus de 6 mois dans le sérum des patients, et se divise en 5 phases de durée variable et qui ne sont pas forcément consécutives (305) :

- La **phase d'immunotolérance** se caractérise par une forte réplication virale en l'absence de lésions du foie (antigène HBe ou HBeAg positifs et ALT – alanine aminotransférase normale). Des études récentes ont cependant montré que l'intégration virale et une expansion clonale des hépatocytes peuvent avoir lieu durant cette phase, suggérant que des modifications moléculaires associées au développement du CHC pourraient intervenir dès les phases précoces d'infection (306,307).

- La **phase immunitaire active** est associée à une réponse immunitaire anti-HBV entraînant une baisse de la charge virale et une augmentation du niveau d'ALT. La séroconversion contre l'HBeAg peut survenir durant cette phase.

- La **phase de portage inactif** se caractérise par une faible réplication virale à la suite de la séroconversion anti-HBe. La séroconversion anti-HBs peut survenir dans 1 à 3% des cas durant cette phase. Cependant, en l'absence de séroconversion anti-HBs, le virus n'est pas éliminé et la pathologie peut toujours progresser et des complications survenir.

- La **phase de réactivation** se caractérise par un taux d'ADN d'HBV sérique fluctuant et des ALT élevées. L'hépatite est active et l'HBeAg est indétectable chez certains patients du fait de la sélection de mutants au niveau des promoteurs Core et PreCore.

- La **phase d'infection occulte** se caractérise par un ADN HBV détectable dans le foie et parfois dans le sérum et ce en l'absence de l'HBsAg. L'infection occulte par HBV est le résultat d'une réplication très basse d'HBV, qui peut être associée à une régulation épigénétique négative de la forme persistante du génome viral, l'ADNccc (308,309).

L'infection chronique par HBV accroît les risques de développement de fibrose, cirrhose et de CHC. Globalement, 8 à 20% des porteurs chroniques évoluent vers la cirrhose qui augmente le risque de décompensation hépatique et d'évolution vers le CHC (305).

#### ***II.1.4. Traitements***

- **Traitements actuels**

Depuis le début des années 80, le vaccin contre HBV a joué un rôle important dans la prévention de cette infection. Découvert en 1976, le premier vaccin a été obtenu en purifiant l'HBsAg à partir du sang de patients porteurs d'HBV (310) et, dès 1986, des vaccins anti-HBV recombinants ont été commercialisés. L'HBsAg est un antigène très immunogène qui entraîne la production d'anticorps neutralisants protecteurs contre HBV. La vaccination contre HBV présente une efficacité de 95% et une protection pour plus de 10 ans. Elle permet de réduire très fortement l'incidence

du CHC dans les régions endémiques (295). Cependant la couverture vaccinale reste encore largement insuffisante en raison de problèmes économiques, logistiques et, parfois, culturels. De ce fait le nombre de porteurs chroniques d'HBV reste extrêmement élevé.

A ce jour, aucun des traitements curatifs disponibles ne permet la guérison complète de l'infection chronique à HBV. En effet, s'ils permettent de réduire la réplication virale et donc l'incidence de la cirrhose et du CHC, ces traitements n'éliminent pas le génome viral qui persiste sous une forme épisomale capable de réactivation dès l'arrêt du traitement.

Les thérapies par l'**interféron  $\alpha$**  (IFN- $\alpha$  conventionnel ou pégylé) permettent une activation du système immunitaire inné (311) ainsi qu'une action directe sur HBV en induisant une diminution de l'activité transcriptionnelle du génome viral (312), une dégradation de l'ARN pré-génomique (313) et une élimination des capsides contenant de l'ARN (314). L'IFN- $\alpha$  est administré pour une durée limitée et conduit parfois (1 à 3 % des cas) à une séroconversion anti-HBsAg qui témoigne d'une guérison complète. Toutefois, il est efficace chez seulement 25-30% des patients éligibles à ce traitement (en fonction de la phase de la maladie et du génotype viral) et il est souvent mal toléré (315,316).

Les **analogues de nucléosides** (NUC) inhibent la polymérase virale en s'incorporant dans les nucléocapsides virales lors de l'étape de reverse-transcription, entraînant l'arrêt de la synthèse nucléotidique. Ils comprennent les L-nucléosides tels que la lamivudine (3TC) ou la telbivudine, les acyclic-phosphonates tels que l'adéfovir (ADF) et le ténofovir disoproxil fumarate (TDF) et, enfin, les cyclopentanes dont le chef de file est l'entécavir (ETV). Ils sont efficaces pour réduire la charge virale et bien tolérés, mais doivent être administrés à vie car l'arrêt du traitement entraîne, dans la majorité des cas, un rebond de la réplication virale (ADN d'HBV détectable dans le sérum des patients et exacerbation des signes cliniques) (317).

- **Nouvelles stratégies antivirales**

Avec une couverture vaccinale mondiale qui est loin d'être totale et des traitements curatifs au long cours qui ne permettent que très rarement une éradication

du virus et une guérison (séroconversion anti-HBs), l'attente en direction des nouvelles thérapies est très grande. L'objectif idéal serait de développer des traitements conduisant à une cure totale, c'est-à-dire à l'élimination du génome viral (l'ADNccc) de tous les hépatocytes. Des études expérimentales ont montré que cela est possible en induisant une déstabilisation ou une dégradation de l'ADNccc sans pour autant affecter l'hépatocyte (destruction non cytotytique). Cependant la faisabilité de ces types d'approche chez les patients reste encore extrêmement faible. C'est pourquoi les recherches s'orientent plutôt vers des stratégies conduisant à une cure fonctionnelle, c'est-à-dire une inhibition permanente de la transcription et de la réplication virale (318,319). Il s'agit en particulier de stratégies utilisant :

- Les inhibiteurs d'entrée tels que le Myrcludex® B qui bloque l'interaction du virus avec son récepteur spécifique, le cotransporteur de sodium thaurocholate (NTCP). Cela permet de réduire la dissémination des particules virales lorsqu'il est administré à des porteurs chroniques. Les résultats préliminaires d'études cliniques ont montré que le Myrcludex® B induit une diminution de la virémie après 6 mois de traitement (320,321).

- Les immunomodulateurs tels que les agonistes de TLR (toll-like receptors) pour stimuler une réponse immunitaire anti-HBV plus efficace.

- Les inhibiteurs de la capsid : la protéine de capsid (HBc ou Core) est essentielle à la réplication virale, en particulier pour ses fonctions dans la formation des nouvelles nucléocapsides et leur transport intra-cellulaire (cf §2.2.4). Les inhibiteurs de cette protéine, appelés modulateurs allostériques de Core (CAM), sont étudiés depuis plusieurs années et deux catégories ont été développées : les PP (Phenylpropenamides derivatives) ou CAM de classe 1, entraînent la formation de capsides de structure normale mais vides ; les HAP (Hétéroaryldihydropyrimidines) ou CAM de classe 2, accélèrent la formation des capsides et leur donnent une forme aberrante pouvant même induire leur dégradation à forte dose. Les études sur la protéine de capsid suggèrent des fonctions régulatrices de cette protéine lors de la réplication d'HBV, ce qui ouvre de plus grandes perspectives pour cette classe de molécules (322).

- Cibler le génome d'HBV est une dernière option pour laquelle des stratégies spécifiques sont aussi en cours d'étude. Idéalement, il s'agirait de développer des

molécules capables de réprimer l'expression de l'ADNccc, la forme persistante du génome viral. Ceci pourrait se faire par des molécules induisant sa déstabilisation, comme la sulforamide disubstituée ou par des enzymes et cytokines qui le dégradent sans affecter l'hépatocyte (nucléases ZnF, système CRISP/Cas9, lymphotoxine  $\beta$ ...). Une autre possibilité moins radicale mais plus réaliste consiste à identifier des molécules capables de réprimer de façon stable la transcription de l'ADNccc en ciblant ses régulateurs épigénétiques et/ou les étapes post-transcriptionnelles par exemple en développant des drogues capables de dégrader les ARN viraux.

L'ensemble de ces stratégies sont actuellement en cours d'évaluation pré-clinique et/ou clinique. Même si le ou les candidat(s) sélectionnés restent encore à définir il est clair que les traitements futurs seront composés d'une combinaison de drogues plutôt que d'un seul type de traitement.

## II.2. Classification et Structure d'HBV

### II.2.1. Classification

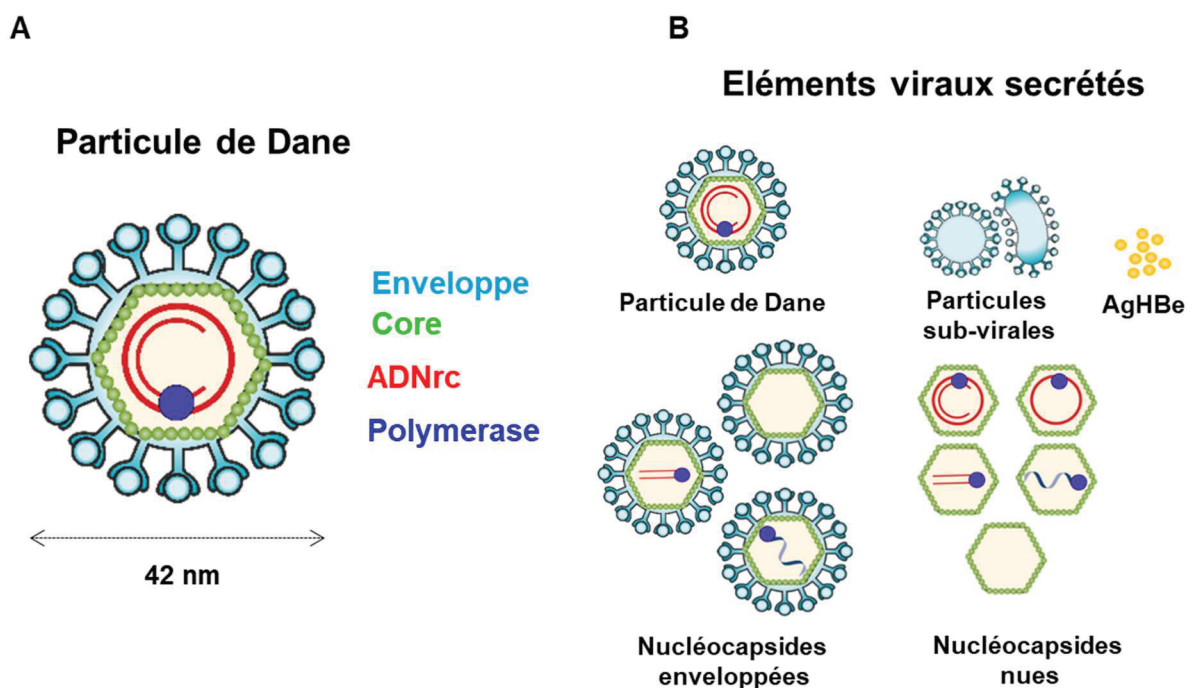
Le virus de l'Hépatite B appartient au groupe VII des virus à ADN double brin à intermédiaire ARN, selon la classification de Baltimore. C'est un *Hepadnaviridae*, famille dont les membres partagent une morphologie semblable, une même organisation génétique, une étape de transcription inverse lors de leur réplication, un tropisme hépatique et une étroite spécificité d'hôte (323). Cette famille est divisée en deux genres, selon l'espèce de l'hôte : les *orthohepadnavirus* sont principalement représentés par le virus de l'Hépatite B humain, par les virus phylogénétiquement proches infectant les primates supérieurs (chimpanzé, gibbon...) et les rongeurs (marmotte, écureuil...); les *avihepadnavirus* infectent les oiseaux comme le canard de Pékin (DHBV) qui est un modèle très utilisé pour l'étude de la biologie du virus (324).

### II.2.2. Les particules virales et sub-virales

La particule infectieuse, ou particule de Dane, a une forme sphérique et mesure environ 42 nm de diamètre (325). Son enveloppe est composée d'une bicouche

lipidique dans laquelle sont enchassées trois protéines virales S-, M-, and L-HBs (pour small, medium, et large HBs; la détection de l'HBsAg regroupe les trois formes) avec un ratio de 4:1:1. Sous l'enveloppe se trouve la capside icosahédrique d'environ 36 nm de diamètre, constituée de 120 dimères de la protéine Core, unité structurale de la capside. Une petite fraction des capsides consiste en un arrangement de 90 dimères d'HBc mais leur caractère infectieux n'a pas été démontré. Enfin, dans la capside se trouve le génome viral qui est un ADN relâché circulaire (ADNrc) partiellement double brin, de 3200 nucléotides, auquel est liée de façon covalente la polymérase virale (Figure 15A).

Dans le sérum des patients, des particules sub-virales (SVP) sont aussi retrouvées (Figure 15B). Il s'agit en particulier d'enveloppes virales dépourvues de génome et de capside qui peuvent être sphériques (20 nm de diamètre environ) ou filamenteuses (22 nm de large, longueur variable) et portent à leur surface les glycoprotéines d'enveloppe virales. Les SVP filamenteuses possèdent une composition similaire à l'enveloppe des particules de Dane, contrairement aux SVP



**Figure 15. Particule infectieuse d'HBV et éléments sécrétés.**

(A) La particule infectieuse d'HBV, ou particule de Dane, est constituée d'une enveloppe bi-lipidique dans laquelle sont enchassées les 3 protéines virales S, M et L. A l'intérieur de l'enveloppe se trouve la nucléocapside composée du génome viral, un ADN circulaire partiellement double brin et relâché (ADNrc) lié à la polymérase virale, et entouré d'un multimère de protéines Core formant la capside virale. (B) Parmi les éléments viraux sécrétés, on trouve les particules infectieuses, les particules sub-virales, l'HBsAg, des nucléocapsides enveloppées vides ou contenant de l'ADNdb ou de l'ARN, et des capsides nues.



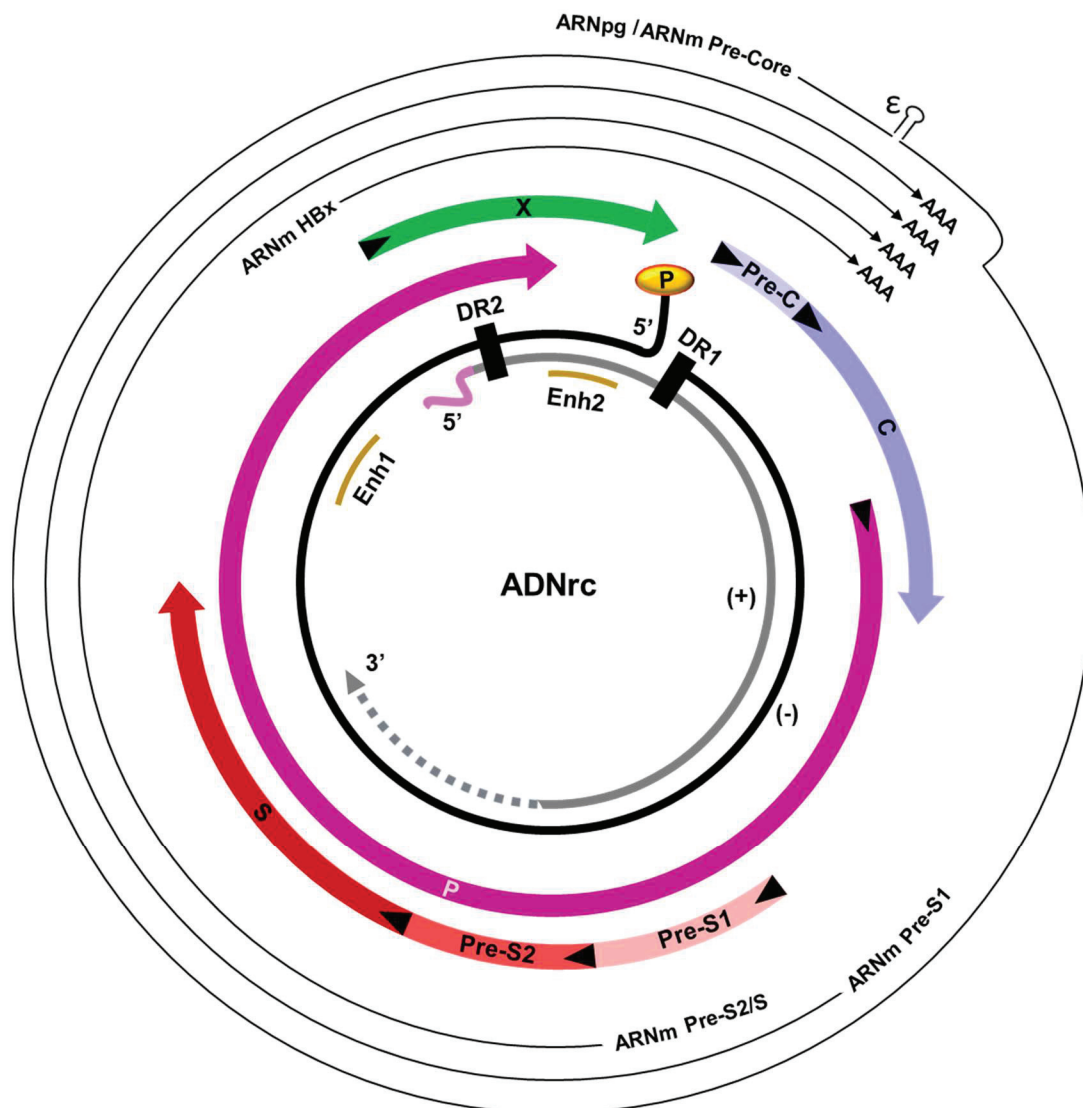
sphériques qui sont majoritairement constituées de protéines S-HBs et de M-HBs alors que L-HBs est présent en quantité très faible. Leur rôle n'est pas bien déterminé, mais leur haute concentration sérique (excès de 1000 à 10000 fois par rapport aux virions) pourrait notamment neutraliser les anticorps anti-HBs et participer à l'échappement immunitaire d'HBV (326). Le deuxième constituant important des surnageants de culture ou des sérums de patients est l'HBeAg, lui aussi fortement sécrété. La mesure de ces deux types d'antigènes viraux (HBsAg et HBeAg) dans les surnageants de culture ou les sérums de patients sert de marqueur indirect du niveau de réplication virale.

En plus de ces éléments, plusieurs autres éléments sont sécrétés dans les surnageants de culture de cellules infectées par HBV ou dans le sang des porteurs chroniques (Figure 15B). Il s'agit en particulier de capsides enveloppées vides ou contenant un intermédiaire ARN et des nucléocapsides non enveloppées qui peuvent être vides, contenir de l'ADN viral, ou des ARN viraux (cf §II.3.3) (Figure 15B) (327–329). Comme on le verra plus tard, l'ARN pré-génomique (ARNpg) qui est reverse-transcrit en ADNrc dans les nucléocapsides peut subir un épissage avant d'être encapsidé (cf §II.4.2). Or, ces ARN épissés peuvent être encapsidés et reverse transcrits, conduisant à la formation de particules virales défectives. Le mode de sécrétion des particules défectives pourrait être différent de celui des particules de Dane (330). Ces particules sont détectées dans le sérum des patients et des études suggèrent qu'un ratio élevé d'ADN défectif d'HBV par rapport à l'ADN sauvage d'HBV serait associé à une nécro-inflammation et une fibrose du foie. Les particules défectives pourraient ainsi représenter un marqueur du stade de l'infection chronique à HBV(331,332).

### ***II.2.3. Structure du génome viral***

L'ADN viral (ADNrc) retrouvé au niveau des particules virales et dans les capsides matures du cytoplasme est relâché, partiellement circulaire et double brin, avec un brin complet de polarité négative (-), et un brin incomplet de polarité positive (+) (Figure 16). Le maintien de la forme circulaire de l'ADNrc est assuré par le chevauchement du brin (+) avec les extrémités 5' et 3' du brin (-), *via* une région cohésive de 200 nt (333). Cette région chevauchante contient les 2 régions répétées

DR1 et DR2, nécessaires pour la réverse transcription. Le brin (-) présente à son extrémité 5' une liaison covalente avec la polymérase virale (334). Le brin (+) a une taille variable du côté de l'extrémité 3' et présente un oligomère ARN en 5' qui provient d'un reste de la molécule d'ARN pré-génomique (ARNpg) qui a servi de matrice à la synthèse du brin (-) (335). 5 à 10% de l'ADN encapsidé peut être une molécule d'ADN



**Figure 16. Structure du génome d'HBV.**

L'ADNrc est composé de deux brins de polarité négative (-) et positive (+). Le brin (+) est incomplet et de longueur variable côté 3'. Il présente un oligomère ARN en 5' (en rose). L'ADNrc possède deux régions inversées répétées DR1 et DR2, deux régions Enhancer (Enh1 et Enh2) et 4 ORF. L'ORF X (en vert) code pour HBx, l'ORF PreC/C (en bleu) code pour les protéines HBeAg et Core (ou HBc), l'ORF P code pour la polymérase et l'ORF PreS1/PreS2/S code pour les protéines d'enveloppe L- M- et S-HBs. Cinq transcrits viraux sont synthétisés à partir du génome HBV : l'ARN pré-génomique (ARNpg) qui code pour les protéines Core et Polymérase ; l'ARN préCore, initié quelques nucléotides en amont de l'ARNpg code pour l'HBeAg ; l'ARNm Pre-S1 est traduit en protéine d'enveloppe L-HBs ; l'ARNm PreS2/S a 2 codons d'initiation permettant la traduction des protéines d'enveloppe M-HBs et S-HBs ; l'ARNm X est traduit en protéine HBx. L'ARNpg/pré-core est le seul à posséder une boucle  $\epsilon$  en 5' qui constitue le signal d'encapsidation de l'ARNpg. Tous les transcrits possèdent une coiffe en 5' et une queue polyA en 3' (adapté de 336).

double brin linéaire (ADN dbl) (Figure 14B). Cette particule est infectieuse et l'ADN dbl est convertit en ADNccc par recombinaison homologue, mais il y a souvent une perte importante de l'information génétique du virus qui mène à la formation de fragments d'ADNccc inaptes à engendrer une réplication virale (337,338). Cet ADN dbl peut aussi s'intégrer dans le génome de l'hôte par recombinaison non homologue, et ce mécanisme ne semble pas avoir de rôle dans la réplication virale car ces formes intégrées sont toujours incomplètes et, donc, incapables de générer des virions infectieux (339). Cependant l'intégration d'HBV peut conduire à la modification du profil d'expression des gènes cellulaires et a été, de ce fait, très étudiée dans le contexte des processus conduisant au CHC (339).

Le génome d'HBV est parmi les plus petits génomes des virus animaux et il présente une organisation très compacte. Il possède quatre ORF qui codent pour 7 protéines (Figure 16) :

- l'ORF Prés1/Prés2/S, avec ses trois codons d'initiation, code pour les trois protéines d'enveloppe ou L-HBs (Large), M-HBs (Medium) et S-HBs (Small) (désignés par HBsAg) ;
- l'ORF Core/PréCore, avec deux codons d'initiation en phase, code la protéine Core ou HBc constituant de la capsid, ainsi que pour le précurseur préCore clivé pour donner l'HBeAg ;
- l'ORF P couvre 80% du génome et chevauche tous les autres cadres de lecture. Il code la polymérase virale P ;
- l'ORF X code pour la protéine X ou HBx (336).

L'expression de ces quatre ORF est contrôlée par quatre promoteurs distincts. Deux séquences « Enhancer » (« Enhancer I et II ») sont aussi présentes ainsi qu'un signal de poly-adénylation (polyA) utilisé pour la terminaison de chaque transcrit (336).

#### ***II.2.4. Les transcrits d'HBV***

Les quatre promoteurs d'HBV contrôlent la transcription des 4 ARNm viraux et de l'ARN subgénomique ou ARNpg. Ils sont tous coiffés en 5' et polyadénylés en 3'.

- l'ARNm PreCore (3,5kb ; 30 nt de plus de l'ARNpg) sert de matrice pour la traduction de la protéine pré-Core ultérieurement clivée pour donner l'HBeAg.

- l'ARNpg (3,5kb) code pour la polymérase virale et la protéine Core. Il est aussi encapsidé, grâce à la présence d'un signal d'encapsidation (boucle  $\epsilon$ ) en 5', et sert de matrice pour la reverse transcription permettant la synthèse de l'ADNrc au sein des capsides néo-assemblées dans le cytoplasme.

- l'ARNm PreS1 (2,4kb) sert de matrice pour la traduction de L-HBs.

- l'ARNm PreS2/S (2,1kb) sert de matrice pour la traduction de M- et S-HBs.

- l'ARNm X (0,8kb) sert de matrice pour la traduction de la protéine X (Figure 16) (326,340,341).

### II.2.5. Les protéines virales

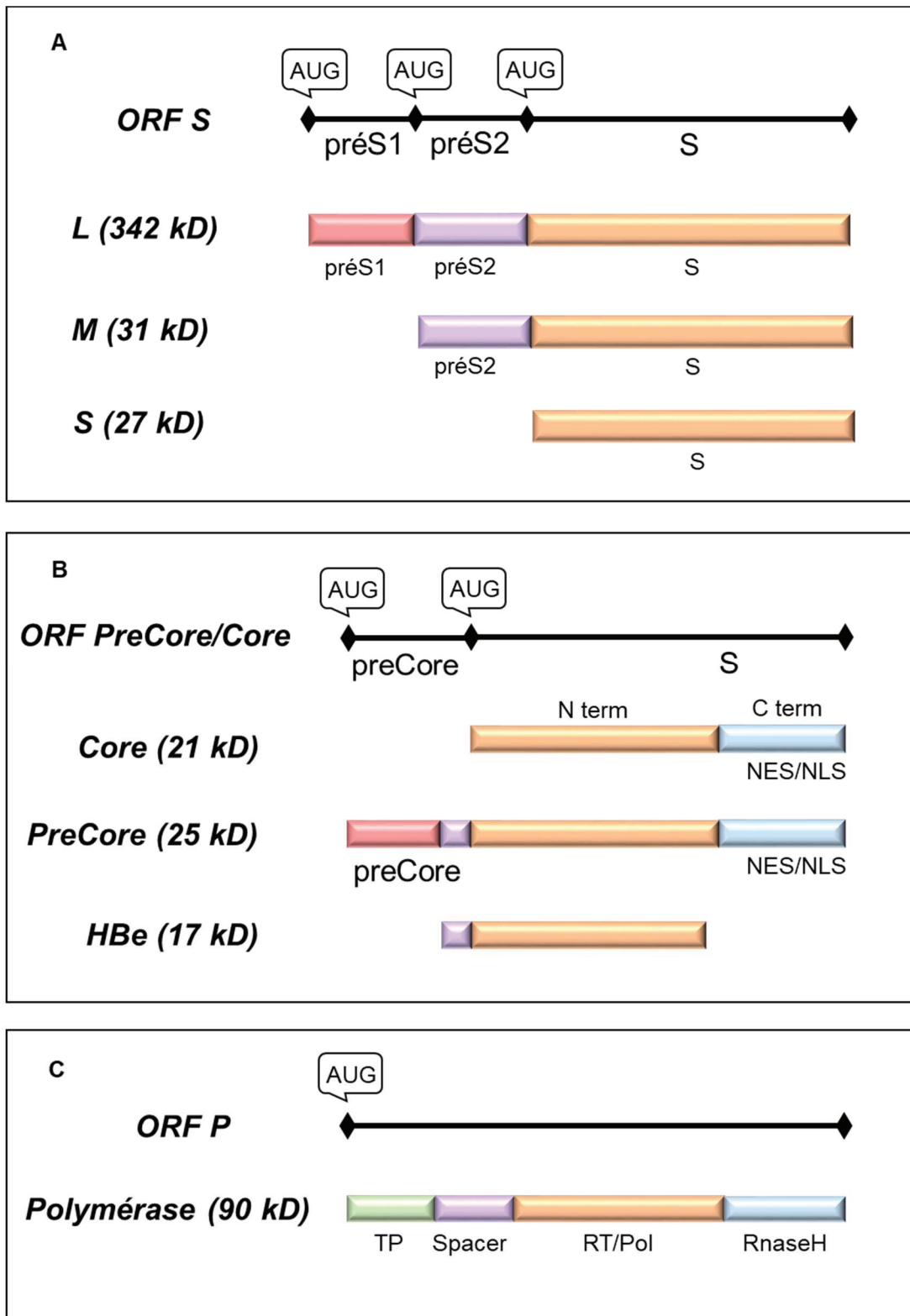
- **Les protéines d'enveloppe L, M et S**

Les trois protéines virales présentes dans les enveloppes des virions (HBsAg) possèdent le même domaine C-terminal hydrophobe capable de s'intégrer aux membranes lipidiques. Elles diffèrent par leur extrémité N-terminale (Figure 17A). Les protéines d'enveloppe sont en partie exposées à la surface des virions et jouent ainsi un rôle déterminant dans la fixation du virus aux molécules d'attachement et au récepteur cellulaires et donc dans le pouvoir pathogène d'HBV.

La **protéine S (S-HBs)** est très hydrophobe avec ses quatre domaines transmembranaires (I à IV). Lors de l'assemblage des virions, le domaine N terminal de S-HBs est localisé dans la lumière du RE alors que la partie C terminale se trouve vers le cytoplasme (342). S-HBs présente une **boucle antigénique** exposée à l'extérieur des virions, cible des anticorps neutralisants anti-HBs. Cette protéine est essentielle aux étapes d'assemblage, de sécrétion et d'infectivité des particules virales (343).

La **protéine M (M-HBs)** adopte la même structure que la protéine S, avec un domaine N terminal plus long exposé à l'extérieur de la particule virale. Les fonctions de cette protéine ne sont pas élucidées : elle n'est pas essentielle à l'entrée du virus dans les hépatocytes ni aux étapes du cycle viral, mais, elle est très conservée chez tous les *orthohepadnavirus* ce qui suggère un rôle important (344).

La **protéine L (L-HBs)** est indispensable aux étapes de reconnaissance des hépatocytes par le virus, à son internalisation et à la formation des nouvelles particules



**Figure 17. Les protéines virales.**

(A) L'ORF S code pour les protéines L-, M- et S-HBs qui diffèrent par la présence de régions additionnelles en 5', pré-S1 et pré-S2. (B) L'ORF PreCore/Core code pour la protéine Core dont le domaine C terminal comporte un signal d'export nucléaire (NES) et un signal de localisation nucléaire (NLS). Ce même ORF code aussi pour le précurseur PreCore qui est ensuite clivé en HBeAg. (C) L'ORF P code pour la polymérase virale composée des domaines TP, Spacer, RT/Pol et RNaseH.

infectieuses. Le domaine N-terminal possède un site de myristylation nécessaire à l'ancrage de la protéine dans l'enveloppe virale. Cette modification n'est pas essentielle à la formation de nouvelles particules virales, mais à leur pouvoir infectieux (345). Au cours de l'assemblage des virions, L-HBs peut prendre deux formes transmembranaires : **i-prés** est la forme interne dans laquelle l'extrémité N terminale est exposée vers le cytosol ; **e-prés** la forme externe dans laquelle l'extrémité N terminale est exposée vers la lumière du RE. La topologie i-prés permet à la protéine L-HBs d'interagir avec les nucléocapsides. Le basculement entre les deux formes a lieu dans le RE ou dans le pré-Golgi. Lors du bourgeonnement des virions, les régions preS1 et preS2 se trouvent à la surface des particules : c'est la topologie e-prés qui permet l'interaction du domaine PreS1 avec le récepteur membranaire hépatocytaire NTCP d'HBV (Sodium taurocholate cotransporting polypeptide) (346,347). L'inhibiteur de l'entrée virale Myrcludex B<sup>®</sup> est un peptide analogue de la région PreS1 de la protéine L-HBs qui inhibe l'entrée des particules d'HBV par compétition avec le récepteur NTCP (348).

- **La protéine Core**

La protéine de capsid Core (21 kD) est composée de 183 à 185 acides aminés selon le génotype d'HBV, et constitue l'unité structurale de la capsid. Il existe quatre variants d'HBc quasi-équivalents qui peuvent s'organiser selon deux symétries : T=4, symétrie la plus fréquente, avec 120 dimères et T=3, avec 90 dimères (349). Elle présente deux domaines : un domaine N-terminal et un domaine C-terminal qui sont séparés par un court domaine charnière (Figure 17B). Le domaine N-terminal (NTD) est impliqué dans la formation des dimères de Core et leur auto-assemblage en capsid (350). Le NTD est aussi impliqué dans l'enveloppement des nucléocapsides (351). Le petit domaine charnière se trouve du côté interne de la capsid et pourrait intervenir dans l'étape d'encapsidation (352). Le domaine C-terminal (CTD) n'est pas essentiel à l'assemblage des capsides, mais comporte différentes régions régulatrices indispensables au cycle réplcatif. Le CTD est riche en arginines et en sérines qui peuvent être phosphorylées. Le niveau de phosphorylation de Core conditionne sa localisation cellulaire, l'encapsidation de l'ARNpg et sa reverse transcription, ainsi que la maturation de la capsid (353). On trouve dans ce domaine une séquence de localisation nucléaire (NLS), impliquée dans l'adressage des capsides au noyau (354),

et une séquence d'export nucléaire (NES) qui peut interagir avec le facteur d'export TAP, impliqué dans l'export nucléo-cytoplasmique des ARNm et des protéines *via* les pores nucléaires (NPC) (355).

La protéine Core possède non seulement des fonctions structurales essentielles pour la formation des capsides, mais aussi des fonctions régulatrices de l'encapsulation de l'ARNpg, de sa reverse transcription et du transport des capsides. Grâce à sa séquence NLS, Core est aussi présente dans le noyau où elle aurait un rôle régulateur additionnel. En effet, Core se lie à l'ADNccc très précocement après sa formation et module l'espacement des nucléosomes. De plus, sa présence est corrélée à une transcription active de l'ADNccc (356). Enfin, plusieurs études suggèrent un rôle de Core dans la régulation du métabolisme des ARN qui sera explicité dans la sous-partie II.4.

- **La protéine HBeAg**

L'ARNm PreCore conduit à la synthèse du **précurseur préCore de 25 kD** qui contient les mêmes domaines CTD et NTD que la protéine Core, avec une extension de 29 acides aminés en N terminal (Figure 16B) (354). Ce précurseur subit un double clivage dans le réticulum endoplasmique : le premier clivage en N-terminal permet l'obtention du précurseur P22 (préCore de 22kD), le second au niveau C-terminal permet d'obtenir la protéine HBeAg de 17 kD (Figure 17B) (357). Ainsi, HBe partage de fortes homologues de séquence mais pas de structure avec HBc. En particulier, la présence d'un résidu cystéine additionnel (provenant de l'extrémité N-terminale d'HBe) crée un pont disulfure qui est absent dans HBc et qui conduit à un repliement spécifique d'HBe qui lui permet de former des dimères mais pas de s'assembler en capside (358,359).

L'HBeAg est une protéine non structurale qui est retrouvée en grande quantité dans le sérum des patients infectés par HBV. Elle est sécrétée sous forme dimérique mais n'est pas impliquée dans le pouvoir infectieux ni la réplication du virus. L'HBeAg aurait plutôt un rôle immunomodulateur en exerçant un rôle tolérogène sur les lymphocytes T (360). De plus, l'HBeAg peut franchir la barrière hémato-placentaire et exerce ainsi son effet tolérogène *in utero*, ce qui expliquerait en partie le fréquent passage à la chronicité observé lors de la transmission de l'infection entre mère et

enfant (361). De façon intéressante, le précurseur P22 d'HBe peut s'assembler en pseudo-capsides, qui peuvent être enveloppées et secrétées mais qui sont dépourvues d'acides nucléiques. Ces particules pourraient intervenir dans le phénomène d'immunotolérance induit par HBV et donc participer à la persistance de l'infection. Les niveaux de sécrétion en HBeAg sont un marqueur de la réplication active du virus, et la sero-conversion vis-à-vis de cet antigène signe la fin de la réplication et l'évolution vers le stade de porteur inactif d'HBV (cf §II.1.3) (362).

Les hépatites chroniques HBeAg-négatives sont des formes chroniques d'infection par un virus de l'hépatite B mutant, incapable de produire l'HBeAg souvent à cause de l'apparition de mutations au niveau du promoteur préCore ou dans la séquence d'HBe (363,364). Les patients infectés par ces mutants possèdent des anticorps anti-HBe mais l'infection chronique perdure (365). Parmi les patients possédant le phénotype HBsAg (+) /HBeAg (-), les porteurs de la mutation sont très nombreux dans le bassin Méditerranéen et en Asie (366).

- **La Polymérase Virale**

La polymérase virale (230 aa, 90kD) est la seule protéine virale qui possède une activité enzymatique. Son activité est la cible majeure des traitements anti-HBV actuels (cf §II.1.4). La polymérase virale est composée de 3 domaines : TP pour Terminal Protein, RT pour Reverse Transcriptase, et un domaine RNaseH. Il y a aussi un domaine charnière entre les domaines TP et RT (Figure 17C) (367).

Le **domaine TP** se lie au signal d'encapsidation  $\epsilon$  à l'extrémité 5' de l'ARNpg, ce qui amorce la synthèse du brin d'ADN (-). Le **domaine RT** possède deux activités enzymatiques. L'activité reverse transcriptase permet la synthèse du brin d'ADN (-) à partir de l'ARNpg, et l'activité d'ADN polymérase ADN-dépendante permet la synthèse du brin d'ADNrc (+) à partir du brin (-) (Figure 18, étapes 6 et 7). Le domaine RT n'a pas d'activité 3'-5' exonucléase ce qui autorise des erreurs et induit une variabilité génomique (368,369). Ces deux premiers domaines sont séparés par le **domaine charnière** (ou spacer) qui assure la flexibilité de la protéine pour un bon fonctionnement de ses activités catalytiques. Ce domaine ne portant pas d'activité primordiale, il peut tolérer de nombreuses mutations, ce qui explique la variabilité de longueur de la polymérase (367). Le **domaine « RNase H »** possède une activité



ribonucléasique qui permet la dégradation de l'ARNpg après la synthèse du brin (-). Cette dégradation est incomplète et laisse une petite amorce ARN nécessaire à l'initiation de la synthèse du brin d'ADN (+) (370).

- **La protéine HBx**

HBx est la plus petite des protéines d'HBV (154 aa, 17kD). C'est une protéine multifonctionnelle produite à un niveau très bas, durant l'infection aiguë et chronique, mais essentielle à la réplication complète du virus chez les *orthohepadnavirus* (371–373). Elle transactive les promoteurs de l'ADNccc mais pas de l'ADN viral intégré (341,374). Bien qu'HBx ne semble pas pouvoir se fixer directement à l'ADN, elle interagit avec des facteurs de transcription et régule l'expression de gènes cellulaires impliqués dans l'apoptose ou la réparation de l'ADN (375). HBx est aussi un régulateur épigénétique qui se lie aux enzymes de modification des histones. Malgré son faible pouvoir oncogène, il semble qu'en intervenant dans de multiples voies HBx puisse participer au développement de l'HCC associé à HBV (376,377). Enfin, il a été montré qu'HBx induit la dégradation du complexe SMC5/6 qui est un facteur de restriction majeur de l'ADNccc (378).

Ces sept protéines virales sont toutes produites à partir d'ARN non épissés. Cependant, comme on le verra par la suite, des formes épissées des ARNm d'HBV sont produites et bien qu'elles ne soient pas nécessaires à la réplication virale, elles conduisent à la synthèse de trois protéines virales additionnelles : HBSP, P-S et HBDSP (cf §II.4.1).

## **II.3. Le cycle répliatif d'HBV**

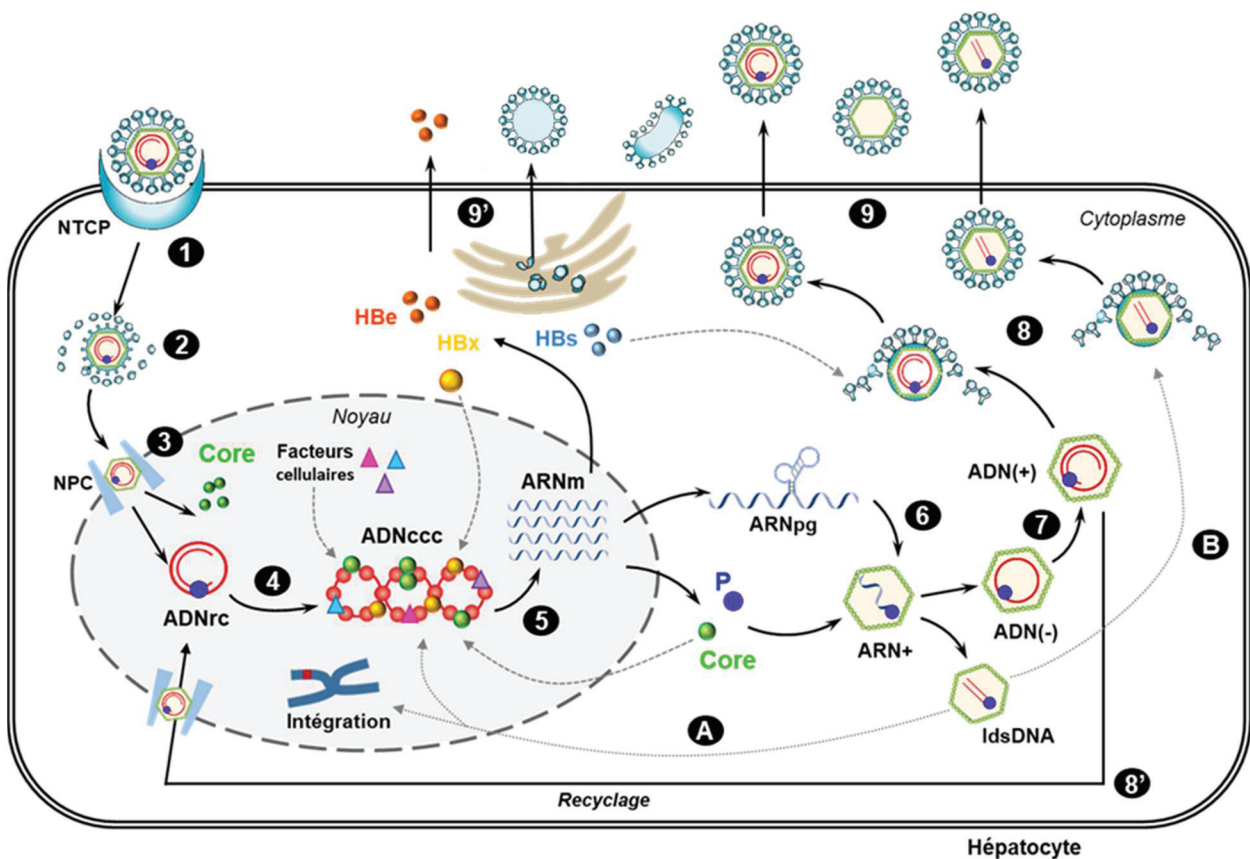
### ***II.3.1. Entrée et libération du génome viral***

L'attachement des virions aux hépatocytes est réalisé grâce à l'interaction des protéines d'enveloppe virale avec des composants de la matrice extracellulaire, en particulier les HSPG (Heparan Sulfate ProteoGlycans) (379,380). Cette fixation est de faible affinité et réversible, et d'autres co-récepteurs pourraient intervenir dans l'attachement d'HBV, tels que le Glypican-5 identifié dans une étude récente (381).

L'interaction d'HBV avec l'hépatocyte est renforcée par une interaction forte et spécifique entre les protéines d'enveloppe et le récepteur NTCP (Figure 18.1). Ce récepteur se trouve au niveau de la membrane basolatérale des hépatocytes et il est impliqué dans le transport des sels biliaires. L'inhibition du récepteur NTCP abolit la permissivité des cellules susceptibles à l'infection par HBV et, au contraire, sa présence rend possible l'infection des cellules d'hépatomes normalement non permissives à HBV (347). Les protéines d'enveloppe sont cruciales pour l'entrée d'HBV : la protéine L-HBs lie le récepteur NTCP via son domaine N terminal, permettant l'internalisation du virus (178), et la boucle antigénique de S-HBs est elle aussi impliquée dans le pouvoir infectieux des particules de Dane (343,383).

Les mécanismes impliqués dans l'internalisation du virus sont encore mal identifiés. L'entrée pourrait se faire par fusion directe des membranes virales et cytoplasmiques, mais certaines études ont montré qu'une pénétration par endocytose clathrine et/ou cavéoline dépendante serait aussi possible (384,385).

Après l'entrée, la nucléocapside est relâchée dans le cytoplasme. Le domaine C terminal des protéines de capsid qui porte la séquence NLS est exposé à l'extérieur de la nucléocapside ce qui lui permet d'être transportée à la périphérie du noyau en une quinzaine de minutes, *via* les microtubules (Figure 18.2). Deux modèles ont été proposés concernant la localisation du désassemblage de la nucléocapside. La nucléocapside pourrait se désassembler à proximité des NPC et l'ADNrc libéré serait alors rapidement pris en charge par les importines pour traverser la membrane nucléaire. Un deuxième modèle prévoit qu'après liaison de la nucléocapside aux importines, en particulier l'importine  $\beta$ , le complexe interagirait avec Nup153, composant des NPC. Le désassemblage surviendrait dans le panier nucléaire, qui se trouve sur la face interne de la membrane nucléaire, et résulterait en la libération de l'ADNrc lié à la polymérase virale et de monomères ou dimères de Core dans le noyau (Figure 18.3) (386). Ce second modèle pourrait expliquer la très faible réponse immunitaire provoquée par l'entrée d'HBV, du fait de l'absence d'exposition du génome viral aux senseurs d'acides nucléiques dans le cytoplasme (387).



**Figure 18. Cycle répliatif d'HBV.**

(1) Les particules infectieuses interagissent avec le récepteur NTCP et entrent dans les hépatocytes. (2) Les nucléocapsides sont transportées *via* le système des microtubules vers la membrane nucléaire. (3) Le génome viral, l'ADNrc, et la protéine de capsid Core sont libérés dans le noyau. (4) L'ADNrc est ensuite converti en ADNccc, minichromosome support de la (5) transcription virale. Les ARNm viraux permettent la synthèse des 7 protéines virales. (6) L'ARN pré-génomique est quant à lui encapsidé par les protéines Core nouvellement formées. (7) L'ARN est reverse transcrit en ADNrc dans la capsid, et la polymérase virale reste liée à l'extrémité 5' du brin (-) de l'ADNrc. La production de capsides contenant un ADN linéaire double brin (ADNIdb) peut survenir et être soit recyclées au noyau (A) soit enveloppées et sécrétées (B). La libération de l'ADNIdb peut entraîner une intégration du génome viral dans le génome de l'hôte, ou donner une fraction de l'ADNccc. (8) Les nucléocapsides formées sont soit enveloppées soit (8') recyclées dans le noyau pour alimenter le pool d'ADNccc. (9-9') Les nouvelles particules virales, les particules sub-virales ainsi que l'HBeAg sont sécrétés dans l'espace extra-cellulaire.

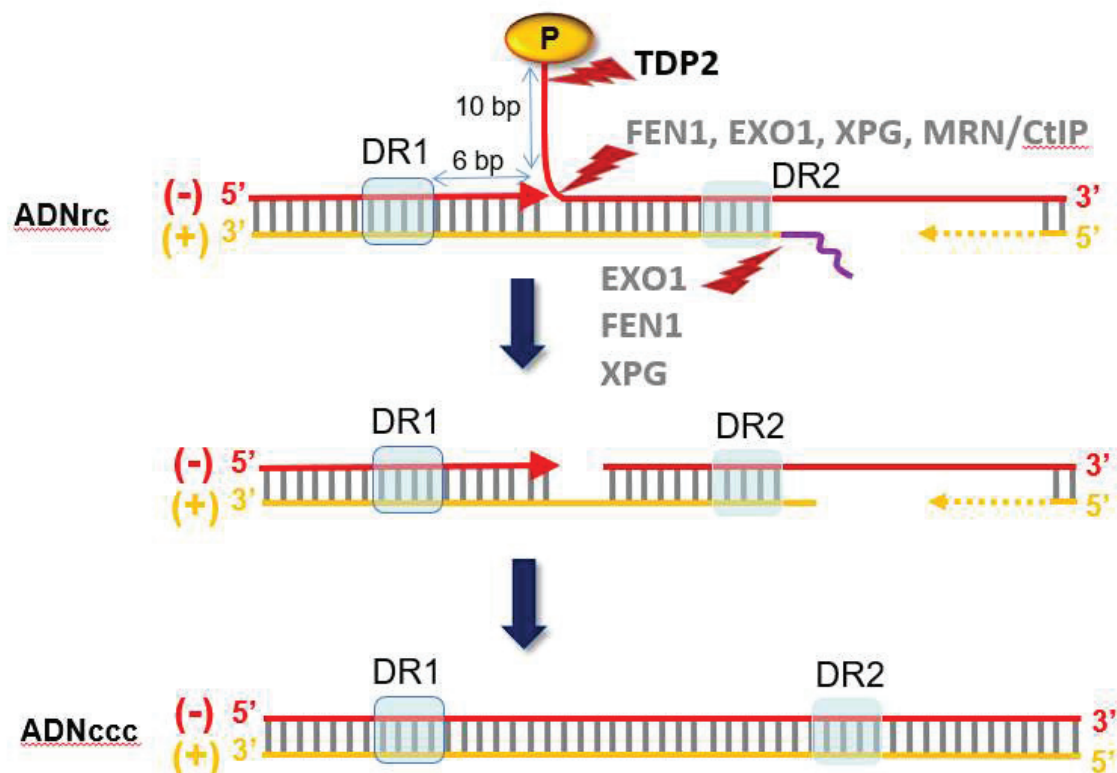
### II.3.2. Formation de l'ADNccc

Une fois dans le noyau, l'ADNrc doit être converti en un ADN circulaire clos de façon covalente (ADNccc) et chromatinisé (Figure 18.4). Le mini-chromosome viral ainsi obtenu est le support de la transcription virale et constitue l'entité responsable de la persistance de l'infection par HBV dans les hépatocytes.

Le processus de conversion de l'ADNrc en ADNccc requiert différents étapes (Figure 19) (324) :

- le clivage de la polymérase virale (P) et l'élimination de la région redondante en 5' du brin (-)
- la dégradation de l'oligomère ARN en 5' du brin (+)
- la synthèse de la partie manquante du brin (+)
- la ligature de chaque brin.

Plusieurs facteurs cellulaires pourraient intervenir dans la formation de l'ADNccc (Figure 19). Cependant, peu d'entre eux ont été identifiés à ce jour et cette étape du cycle viral reste encore méconnue.



**Figure 19. Conversion de l'ADNrc en ADNccc.**

Pour obtenir un ADN circulaire de façon covalente, la polymérase virale doit être clivée de l'ADNrc. La région redondante en 5' du brin (-) et l'oligomère ARN en 5' du brin (+) doivent être éliminés. Les parties manquantes de la séquence du brin (+) sont synthétisées par la polymérase virale, et chaque brin est ligaturé (388). L'enzyme TDP2 clive la polymérase virale, et les enzymes FEN1, XPG, EXO1, MRN/CtIP pourraient participer au clivage de la polymérase, de l'extrémité 5' du brin (-), ou de l'amorce ARN en 5' du brin (+).

Une étude récente a montré que l'enzyme TDP2 (Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 2), responsable du clivage des complexes Topoisomérase II-ADN, peut décrocher la polymérase virale à l'extrémité 5' du brin (-) de l'ADNccc et permettre la génération d'un ADNrc-PF (protein-free). Mais l'inhibition de TDP2 par siRNA retarde mais n'empêche pas complètement la formation de l'ADNccc, ce qui suggère que d'autre(s) enzyme(s) pourraient aussi intervenir (388,389). La localisation de l'étape de clivage de P fait débat. Köck *et al.* ont montré que très peu d'ADNrc-PF était détecté dans le cytoplasme et que 10% de l'ADNrc dans le compartiment nucléaire (pore nucléaire et noyau) était encore lié à P (390), suggérant un clivage de P préférentiellement nucléaire.

Pour la digestion de la région redondante en 5' du brin (-) et de l'oligomère ARN du brin (+), il semble que l'activité exo et/ou endonucléase d'une enzyme de réparation cellulaire soit requise. Ainsi, l'endonucléase Flap 1 (FEN1) peut suffire à toutes les étapes de conversion en présence d'une ADN polymérase et d'une ligase (391), mais il n'est pas exclu que d'autres enzymes de ce type puissent intervenir dans le processus, telles que XPG, Exo1, ou des endonucléases comme MRN/CtIP (388,392).

Pour compléter le brin positif, l'implication de la polymérase virale a été écartée puisque son inhibition n'empêche pas la synthèse de l'ADNccc. Parmi les ADN polymérases cellulaires, POLk semble avoir un rôle critique dans cette étape. Pour terminer la synthèse de l'ADNccc, chaque brin doit être ligaturé pour former un ADN circulaire parfaitement clos. Le complexe XRCC1-Lig3 qui agit dans le NER (Nucleotide Excision Repair) avec POLk pour compléter et ligaturer les fragments d'ADN simple brin pourrait être requis lors de la formation de l'ADNccc (392).

Pour aboutir au minichromosome viral, l'ADNccc s'organise en une structure nucléosomale avec les histones H1, H2A, H2B, H3, H4 et H5. Il interagit aussi avec Core, qui serait impliquée dans la régulation de l'espacement des nucléosomes, et avec HBx qui est nécessaire à la transcription virale (393,394). Les modifications post-traductionnelles des histones et l'activité d'HBx permettent la régulation épigénétique du génome viral (395–397).

### ***II.3.3. Transcription virale, encapsidation et reverse transcription***

Les ARN viraux sont transcrits à partir de l'ADNccc par l'ARN polymérase II ADN-dépendante (Figure 18.5). Les transcrits sont coiffés à l'extrémité 5', polyadénylés en 3' et une fois exportés dans le cytoplasme, ils sont traduits en protéines virales (336). Les ARNm viraux non épissés codent pour les 7 protéines virales nécessaires et suffisantes au cycle réplcatif, mais des ARNm épissés sont aussi générés. Longtemps considérés sans fonction, l'étude de ces ARNm épissés a révélé leur importance dans la pathogenèse d'HBV (cf §II.4.3.).

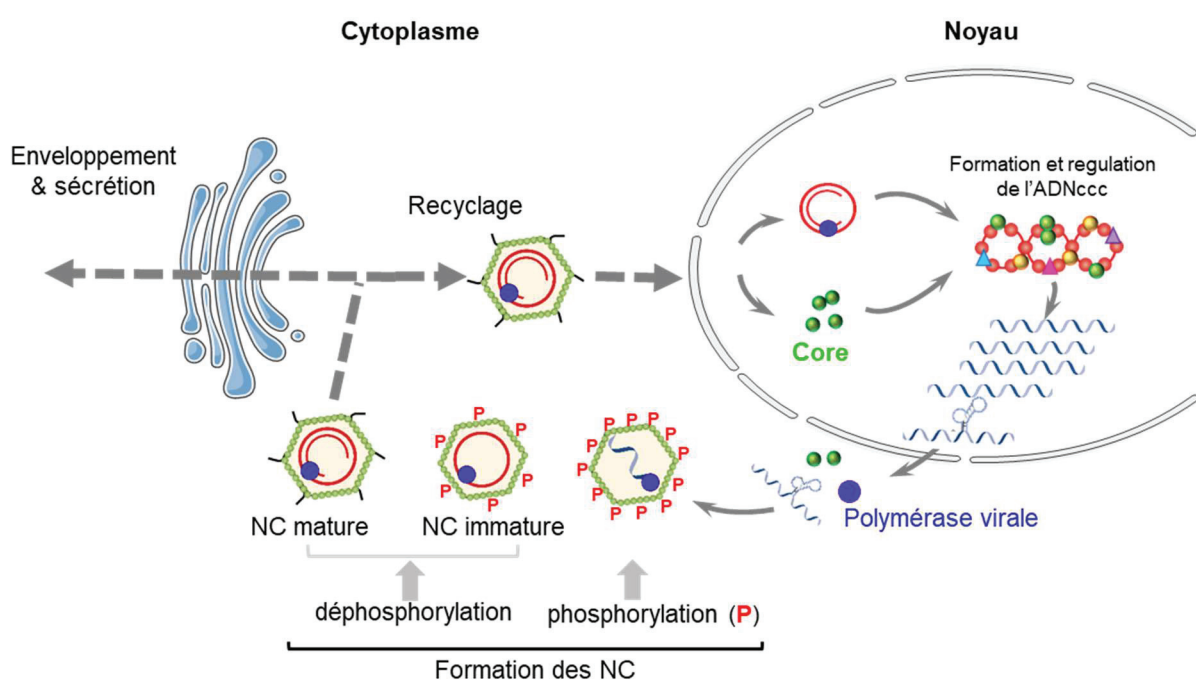
La polymérase virale se lie à l'ARNpg, de façon préférentielle à celui qui a servi de matrice pour sa synthèse, grâce à une liaison entre son domaine TP et le signal d'encapsidation  $\epsilon$  situé en 5' de l'ARNpg (398,399). Le complexe ARNpg-P peut alors interagir avec le CTD hyperphosphorylé de Core pour initier l'encapsidation (Figure 18.6). L'activité chaperonne d'acides nucléiques de Core permet un bon repliement de l'ARNpg et sa transcription inverse en ADNrc (353). A l'intérieur de la capsid, la polymérase virale synthétise le brin d'ADN (-) et la matrice ARNpg est dégradée au fur et à mesure, à l'exception de l'extrémité 5' qui permet l'initiation de la synthèse du brin (+) (Figure 18.7) (400,401). La nucléocapsid subit ensuite une maturation avec une déphosphorylation des protéines de capsid (402,403) qui a pour conséquence de rigidifier la capsid, de la rendre moins perméable aux nucléotides et de permettre au CTD de Core de se localiser à l'extérieur de la capsid. Ce phénomène pourrait être responsable de l'arrêt prématuré de l'élongation du brin (+) de l'ADNrc qui reste donc incomplet.

Dans 10% des cas, la reverse transcription de l'ARNpg aboutit à une molécule d'ADN linéaire double brin (ADNldb). Les nucléocapsides contenant de l'ADNldb peuvent, comme celles contenant de l'ADNrc, être transportées vers le noyau ou bien être enveloppées et sécrétées (Figure 18.A-B). L'ADNldb qui pénètre dans le noyau des hépatocytes peut être converti en un ADNccc (338,339,404) mais aussi servir de substrat pour l'intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte (Figure 18.B), vraisemblablement au niveau des sites de cassures d'ADN double brin et grâce à un mécanisme de NHEJ (405,406). Au cours du processus d'intégration, le promoteur Core est séparé de son ORF, et la production d'un ARNpg est donc impossible. Cependant la transcription d'une partie du génome viral, en particulier de

l'ORF S, est possible. De ce fait, les formes intégrées d'HBV sont responsables de la production d'HBsAg (407) qui influe sur l'immunotolérance vis-à-vis d'HBV et donc sur la persistance du virus. Les événements d'intégration ont été observés avec une fréquence de 1 pour  $10^2$ - $10^4$  cellules chez la marmotte et le canard de Pékin (405,408,409), ainsi que chez les patients humains chroniquement infectés (306,410,411). De plus une étude récente a montré que l'intégration peut survenir très précocement après l'entrée du virus et peut être distribuée tout le long du génome humain (412).

### II.3.4. Devenir des capsides virales

La reverse transcription associée à une déphosphorylation progressive de Core conduit à l'obtention de capsides matures, contenant l'ADNrc (Figure 20). Ces nouvelles nucléocapsides hypophosphorylées peuvent alors interagir avec les protéines cellulaires impliquées dans le trafic cellulaire, pour être enveloppées et



**Figure 20. Maturation de la capside d'HBV et recyclage.**

Dans le noyau, la protéine Core et des facteurs de l'hôte se fixent sur l'ADNccc et régulent sa transcription. Parmi les 5 ARNms transcrits, seul l'ARNpg associé à la polymérase virale est encapsidé. Les nucléocapsides (NC) immatures ainsi formées sont hyperphosphorylées. Les NCs sont ensuite déphosphorylées simultanément à la reverse transcription de l'ARNpg en ADNrc, donnant lieu à des capsides matures. Celles-ci peuvent être soit être enveloppées et sécrétées, soit être recyclées vers le noyau dans le but d'amplifier le « pool » d'ADNccc.

secrétées *via* les MVB (Multi Vesicular Bodies) (Figure 18.8-9) (328), ou bien être recyclées dans le noyau *via* les NPC pour alimenter le pool d'ADNccc (Figure 18.8') (413). Les particules sub-virales s'assemblent, les filaments riches en protéines L sont secrétés *via* les MVB alors que les particules sphériques sont secrétées par l'intermédiaire du Golgi (Figure 18.9') (328,414).

## II.4. HBV et métabolisme des ARN

Le cycle viral d'HBV permet la synthèse de l'ARNpg et de 4 ARNm non épissés, codant pour les 7 protéines virales, et ces ARN sont indispensables à une réplication complète d'HBV. Mais, des ARNm viraux épissés sont aussi générés lors du cycle viral et de plus en plus d'études mettent en lumière leur importance dans la pathogenèse d'HBV.

### II.4.1. Régulation de la transcription virale

De multiples facteurs de transcription ubiquitaires ou spécifiques du foie se fixent sur les quatre promoteurs viraux, et les séquences Enhancer. Celles-ci participent à la régulation de l'expression du génome : Enh1 augmente surtout la transcription des transcrits ARNpg/preCore, et HBx et, dans une moindre mesure, celle des transcrits preS1 et PreS2/S3. Enh2 stimule la transcription des ARNm des protéines d'enveloppe et de l'ARNm HBx. L'élément régulateur négatif NRE est situé en amont du promoteur de Core et il contient 3 sous-régions ayant chacune une faible activité répressive (Figure 21). Leur action synergique exerce une très forte répression transcriptionnelle sur le promoteur Core. La protéine HBx interagit avec de nombreux facteurs de transcription cellulaires pour réguler la transcription virale (341).

La protéine Core semble aussi impliquée dans la régulation de la transcription d'HBV. Sa localisation dans le noyau des hépatocytes a été montrée dans de nombreux systèmes et, chez les patients, la présence de Core dans le noyau est associée à une forte virémie et une réponse immunitaire faible (415,416). Ceci suggère un rôle de Core dans la régulation des étapes nucléaires du cycle viral. Ainsi, la protéine de capsid module l'espacement des nucléosomes de l'ADNccc (394) et sa présence est corrélée à un état transcriptionnel actif du virus (356). De plus, la



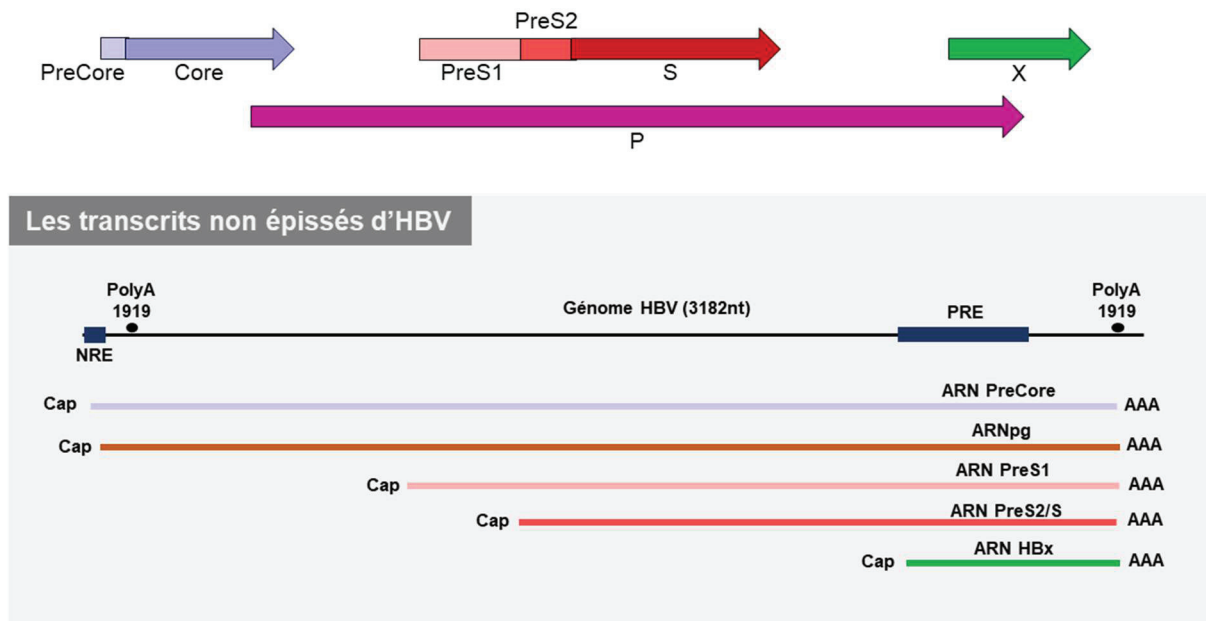
réduction des formes monomériques et dimériques de Core induit une diminution de sa liaison à l'ADNccc et de la production des ARN et des protéines d'HBV (417). La méthylation de Core par PRMT5 semble augmenter sa localisation nucléaire. Or, la surexpression de PRMT5 a été montrée comme ayant un effet épigénétique répresseur sur la transcription d'HBV et sa réplication, suggérant que l'activité de régulation de Core pourrait être perturbée par son état de méthylation (418,419). D'autres études suggèrent un rôle de Core sur la transcription des gènes cellulaires : un criblage génomique a montré la fixation de Core à de nombreux promoteurs cellulaires, par exemple ceux de gènes impliqués dans la réponse à l'interféron. Core pourrait ainsi inhiber leur expression (420). De plus, Core participe à la répression de la transcription de gènes pro-apoptotiques, comme p53 et DR5, potentiellement en se fixant aux facteurs de transcription de ces gènes, comme dans le cas de E2F1 pour p53 (421,422). La protéine de capsidie semble donc posséder de multiples fonctions dans la transcription d'HBV, et pourrait être impliquée tant dans la biogenèse du virus, que dans la tolérance immunitaire et la pathogenèse liée au virus.

Cependant, Core ne semble pas se limiter à des fonctions nucléaires ciblant la transcription mais pourrait aussi être impliquée dans les étapes post-transcriptionnelles du métabolisme des ARN viraux, notamment leur épissage.

#### ***II.4.2. ARN viraux et régulation post-transcriptionnelle***

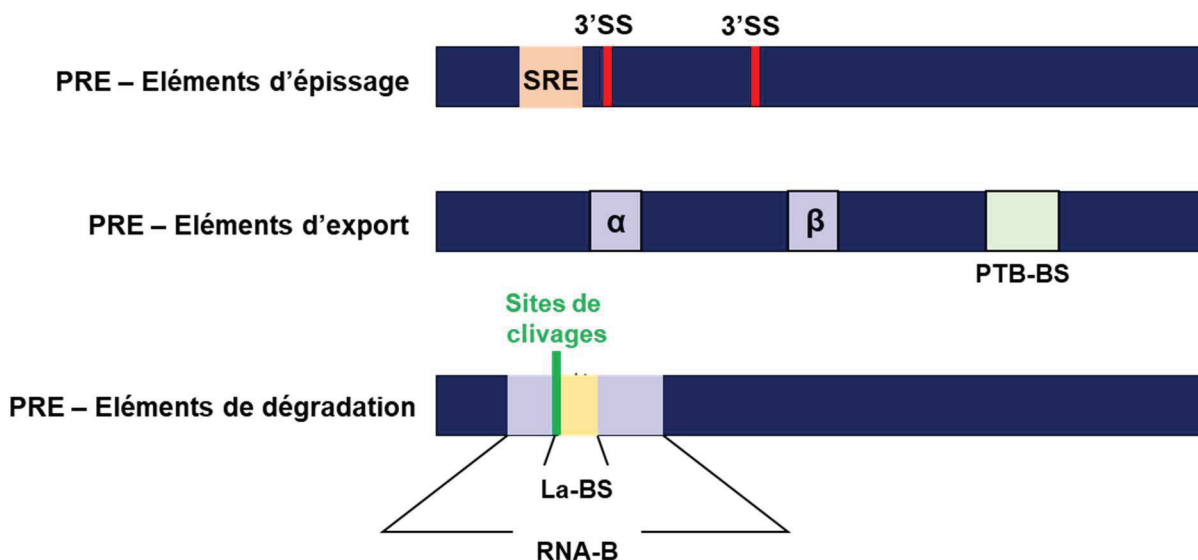
- **Les ARNm non épissés d'HBV**

Les ARN viraux sont régulés au niveau post-transcriptionnel grâce à plusieurs éléments présents sur le génome. Les transcrits d'HBV contiennent tous une séquence régulatrice PRE (Posttranscriptional Regulatory Element) composée de trois domaines qui régulent l'épissage, l'export nucléaire et la stabilité des ARN viraux (Figure 18). Le PRE possède un domaine SRE (Splicing Regulatory Element) en 5' et 2 sites d'épissage en 3'. L'export des ARN d'HBV est assuré grâce aux domaines PRE- $\alpha$ , PRE- $\beta$  et au domaine de liaison au facteur d'épissage PTB (Polypyrimidine Tract-binding Protein). La dégradation des ARN viraux peut être initiée via l'élément RNA-B qui contient deux sites de clivage endoribonucléotidique et un domaine de liaison à la protéine La (423) (Figures 21-22).



**Figure 21. Les transcrits non épissés d'HBV et les protéines correspondantes.**

Localisation de l'élément PRE sur les transcrits non épissés d'HBV. Représentation du génome d'HBV sous sa forme linéaire. Par convention, la numérotation commence au site unique EcoRI qui se situe au milieu de la séquence. L'élément cis-régulateur PRE (Posttranscriptional Regulatory Element) est positionné entre les nucléotides 1200 à 1684 (rectangle bleu) (adapté de 423).



**Figure 22. L'élément cis-régulateur PRE des transcrits d'HBV.**

Le PRE (Posttranscriptional Regulatory Element) est composé de trois domaines de régulation de l'épissage, de l'export et de la stabilité des ARN d'HBV. La régulation de l'épissage se fait grâce au SRE (Splicing Regulatory Element) positionné du côté 5' du PRE (position 1252 à 1288). Il y a deux sites d'épissage en 3' aux positions 1305 et 1385. Les domaines PRE-α (1292-1321), PRE-β (1410-1434) et le site de liaison à la PTB (1527-1536) sont impliqués dans les fonctions d'export des ARN. Le domaine RNA-B (1242-1331) contient le site de liaison à la protéine La (La-BS, 1270-1331) et les deux sites de clivages (1268 et 1270) qui permettent la dégradation des transcrits viraux (adapté de 423).

Le PRE a d'abord été décrit pour son rôle dans l'export des ARN non épissés d'HBV (424,425), comme pour de nombreux virus qui possèdent des séquences similaires pour l'export de leurs ARN sans intron (RRE pour HIV, CTE pour MPMV – Mason Pfizer Monkey Virus, PPE pour HSV-1...) (114,426,427). En l'absence de cet élément, l'ARNm PreS2/S est dégradé dans le noyau, mais pas l'ARN PreC/Core ni l'ARNpg, suggérant que ces ARN sont régulés de manière différente pour être exportés (425). Deux protéines qui interagissent avec le PRE ont été identifiées : la première correspond à la GAPDH et ses fonctions dans la réplication d'HBV n'ont pas été élucidées (428). La seconde correspond au facteur d'épissage PTB qui se lie au niveau du domaine PTB-BS (PTB-Binding Site) du PRE (Figure 22). L'export des ARN viraux est réduit quand le PTB-BS est muté, mais la PTB elle-même n'est pas impliquée dans l'export des ARN viraux, bien qu'elle comporte une séquence d'export nucléaire (429). De même, la protéine La possède un domaine de liaison au PRE et une activité navette entre noyau et cytoplasme. Cependant, son implication dans l'export des ARN viraux reste à déterminer (430,431).

De façon intéressante, la protéine virale Core se fixe au complexe d'export des ARNm TREX (Transcription ARNm Export Complex), et en particulier au facteur d'export NXF1-p15 *via* sa région NES située dans le domaine C-terminal. L'export de l'ARNpg est aussi médié par NXF1-p15. Il est possible que Core puisse, comme les protéines SR, interagir avec les ARN viraux et moduler leur export en participant à la dynamique des complexes ribonucléoprotéiques (432). Core est la seule des protéines d'HBV qui se lie de façon non spécifique à l'ADN et à l'ARN (433) et elle pourrait moduler l'export des ARNm en liant directement ces ARN, et/ou en interagissant avec les protéines déjà fixées sur l'ARN.

Le domaine PRE a été aussi impliqué dans le contrôle de la stabilité des ARN d'HBV. La mutation du site de liaison de la protéine La au niveau du PRE induit une diminution de la demi-vie des ARN d'HBV. De plus, la structure secondaire de la protéine La semble importante dans ses fonction de stabilisation des ARN viraux (434). L'identification des deux sites de clivage endo-ribonucléotidique (ciblés par des RNases) à proximité du site de La, permet de penser que la fixation de cette protéine empêche l'activité des RNases (Figure 22) (435). D'autres facteurs cellulaires modulent la stabilité des ARN viraux, par exemple Myd88 qui est induit par l'IFN  $\alpha$  et qui accélère la dégradation de l'ARNpg (313). De même, l'activation de la voie

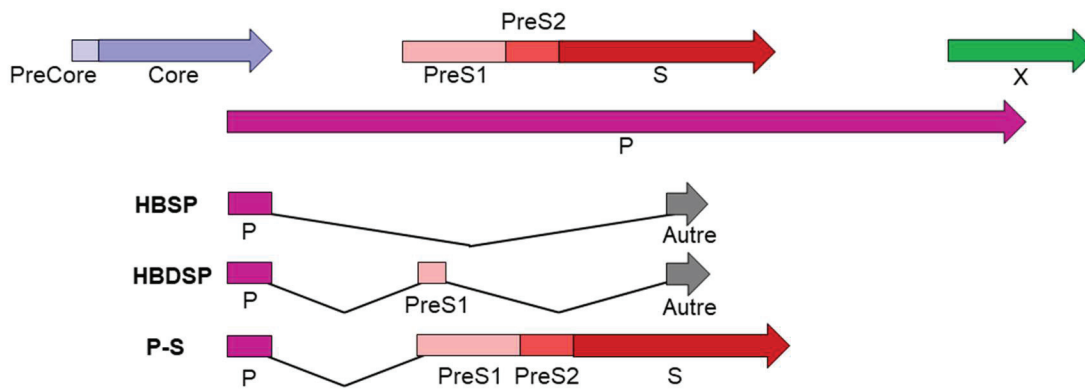
interféron induit l'expression de la protéine antivirale ZAP qui se lie à une ZRE (ZAP responsive Element) située dans la région terminale redondante de l'ARNpg (nt 1820 à 1019), ce qui entraîne la dégradation de cet ARNpg (436).

Finalement, peu de facteurs *trans*-régulateurs du métabolisme des ARN d'HBV ont été mis en évidence, en particulier dans des modèles d'infection d'hépatocytes primaires humains.

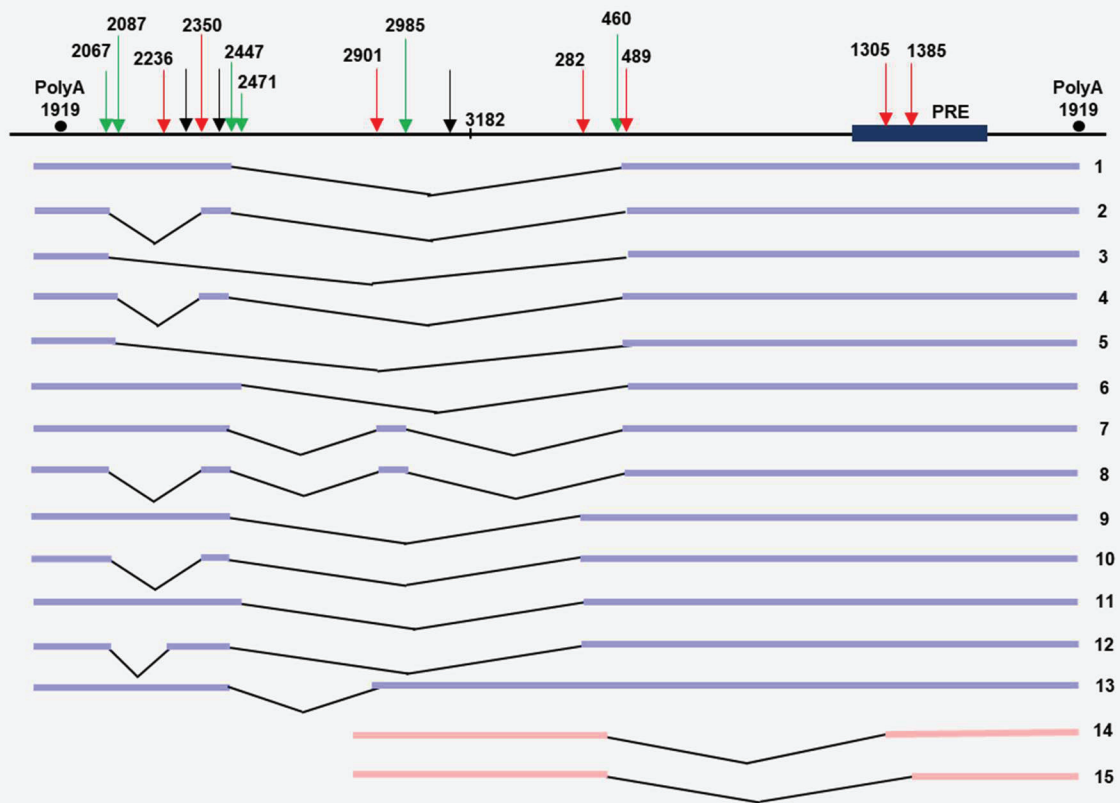
- **Les ARN épissés d'HBV**

A la fin des années 80, un transcrite épissé d'HBV a été identifié dans des cultures d'hépatomes transfectés avec le génome d'HBV. Cet ARN présentait les mêmes extrémités 3' et 5' que les ARNpg et PreCore/Core, avec une délétion de 1233pb s'étendant du dernier codon du gène Core jusqu'au milieu du gène S. Cette région manquante correspond à une séquence intronique, dont l'élimination dépend d'un site accepteur, suggérant que ce transcrite est bien généré par un mécanisme d'épissage. De façon surprenante, dans cette étude Su *et al.* ont suggéré que l'ARN épissé d'HBV pourrait coder pour une protéine non essentielle au cycle viral (437). Par la suite, ce transcrite sera appelé SP1 (Splicing product 1), et 17 ARN épissés d'HBV seront identifiés, dont 15 variants d'épissage de l'ARNpg et 2 variants de l'ARNm PreS2/S (Figure 23) (423,438). Dernièrement, 5 autres variants ont été décrits (439). Ces variants d'épissage ont aussi été identifiés pour des virus de l'Hépatite B infectant d'autres espèces comme le canard et la marmotte (DHBV et WHBV) (440,441).

Les variants SP10 et SP1 ont été détectés dans les cellules HepG2 et dans le foie de patients infectés par HBV (442,443). Dans ces études, les auteurs ont identifié la présence de ces deux transcrits épissés chez une dizaine de patients chroniquement infectés. Dans une étude plus récente de Huang *et al.*, les 11 patients testés présentaient le variant SP1 et seulement 3 présentaient aussi le variant 10 (444). Il semble donc que le variant SP1 soit prépondérant parmi les transcrits épissés ce qui suggère une régulation de l'épissage d'HBV permettant de favoriser certains transcrits plutôt que d'autres. De plus, selon les études, la proportion d'ARN épissé par rapport aux ARN totaux varie d'environ 50% chez les patients asymptomatiques (445,446) à plus de 90% chez ceux atteints d'une hépatite chronique active ou souffrant d'un CHC (447,448).



### Les transcrits épissés d'HBV



**Figure 23. Les transcrits épissés d'HBV, les sites d'épissage et les protéines issues de l'épissage.**

Sur le génome, les sites d'épissage connus sont indiqués avec les flèches vertes pour les 5'SS, et en rouge pour les 3'SS. Les flèches noires représentent les sites d'épissage prédits. Le domaine PRE est représenté par le rectangle bleu. L'épissage d'HBV permet la synthèse de 13 variants à partir de l'ARNpg/ARNPreCore (variants 1 à 13), et de 2 variants à partir de l'ARN PreS2/S (variants 14 et 15) (adapté de 423).

Comme décrit auparavant, le domaine PRE, qui est présent sur tous les transcrits viraux, sert à l'export des ARN viraux non épissés. De façon intéressante, la déplétion du PRE inhibe fortement l'épissage d'HBV, avec un transcrit SP1 qui n'est presque plus détecté. Le PRE comporte un site activateur de l'épissage dont l'absence entraîne une diminution des ARN viraux épissés (SRE, Figure 22). Ceci suggère que l'élément PRE est nécessaire à l'épissage d'HBV. Par ailleurs, la surexpression du facteur activateur d'épissage PSF (PTB-associated Splicing Factor) entraîne une réduction de l'épissage des ARN d'HBV. Cet effet serait dû à l'inhibition de PSF *via* sa fixation à l'élément PTB contenu dans le PRE. Le PRE est donc requis pour activer l'épissage d'HBV mais aussi pour inhiber une stimulation trop importante de cet épissage(449,450). Une étude prédictive des facteurs qui pourraient se lier au domaine PRE a identifié les protéines SRSF1, 2, 6 et SRp45, mais à ce jour, il n'a pas été déterminé si ces protéines régulent réellement l'épissage d'HBV (451,452).

La présence de Core semble aussi être associée aux événements d'épissage d'HBV (453). En effet, l'expression d'un mutant de la protéine Core s'accompagne d'une diminution de la quantité en transcrits viraux épissés (454). De plus, la protéine de capsid du DHBV localise à proximité des Speckles (455). Comme évoqué précédemment, le CTD de Core présente une homologie avec le domaine RS des facteurs d'épissage et elle est phosphorylée par les kinases de la famille des protéines SR, SRPK1 et 2 (291). Il sera intéressant de déterminer si ces kinases modulent l'épissage d'HBV.

### ***II.4.3. Traduction des ARNm viraux épissés et pathogenèse d'HBV***

De plus en plus d'études mettent en lumière l'importance de l'épissage d'HBV dans la réplication virale et la pathogenèse associée à HBV. L'encapsidation de variants épissés de l'ARNpg résulte en la production de particules virales défectives (331,447,456) qui pourraient interférer avec la réplication virale comme cela a été décrit pour d'autres virus (457,458). Cependant, certaines études suggèrent que la co-expression des transcrits d'HBV épissés et non épissés pourrait améliorer la réplication du génome sauvage (448). De façon intéressante, l'augmentation des variants épissés d'HBV constituerait un marqueur prédictif d'évolution vers le CHC

(459) mais serait aussi associée à un défaut de réponse aux thérapies par l'interféron (460).

Actuellement, trois protéines ont été décrites comme pouvant résulter de la traduction des ARN épissés d'HBV : P-S, HBDSP et HBSP (Figure 23). P-S est une protéine de fusion entre les ORF P et S, codée par le variant d'épissage 13 de l'ARNpg. Son domaine N-terminal est composé des 49 premiers AA de la Polymérase et son domaine C-terminal correspond à la séquence de la protéine d'enveloppe L. La protéine P-S a été détectée seulement dans des études *in vitro*, dans des extraits de cellules Huh7 transfectées et au niveau des particules de Dane. Ainsi, P-S n'est pas nécessaire au cycle viral, mais elle pourrait se substituer à la protéine L, être glycosylée et interagir avec la protéine de capsid (461). P-S pourrait ainsi représenter 5 à 10% des protéines L à la surface des virions et comme la protéine L, exercer un rétrocontrôle négatif sur l'expression de la protéine S (462). Cette protéine issue de l'épissage d'HBV pourrait ainsi avoir un rôle de régulation de l'expression virale.

HBDSP (Hepatitis B Doubly Spliced Protein) est une petite protéine issue de la double fusion entre l'ORF P et deux parties de l'ORF S. Comme P-S la partie N terminale de HBDSP est composée des 47 premiers AA de la Polymérase, puis les 92 AA suivant résultent de la fusion de l'extrémité 5' de L avec la région 3' de l'ORF S. Bien que l'ARNpg doublement épissé soit détecté chez les patients infectés chroniquement à HBV, HBDSP n'a été décrite que dans un modèle *in vitro* de Huh7 transfectées. La transfection du plasmide correspondant a permis de mettre en évidence une activité transactivatrice faible d'HBDSP (463). Les conséquences biologiques de l'expression d'HBDSP et de son implication dans la pathogenèse d'HBV restent à éclaircir, en plus de sa présence *in vivo*.

HBSP est la protéine la plus étudiée des protéines issues de l'épissage d'HBV. Elle est codée par l'ARN épissé SP1 et correspond aux 46 premiers AA de la Polymérase, suivis d'une séquence 47 AA créée à partir d'une nouvelle ORF générée lors de l'épissage. Des anticorps anti-HBSP et une réponse T-spécifique à HBSP ont été mis en évidence *in vivo* (464). *In vitro*, HBSP n'est pas nécessaire à la réplication virale (465). Cette protéine présente un domaine homologue à Bcl-2 (BH3) et interagit avec Bcl-2/Bcl-xl qui induit l'apoptose *in vitro* (465–467). Dans une autre étude, la présence d'HBSP et des anticorps anti-HBSP a été associée à une réplication active

d'HBV, à une augmentation du facteur de nécrose tumorale TNF $\alpha$  ainsi qu'à la sévérité de la fibrose hépatique (468). Ces observations ont été précisées par l'implication d'HBSP dans l'inhibition de la polymérisation de la fibrine associée à des anomalies d'hémostase chez les patients présentant des pathologies hépatiques (469). Concernant la progression tumorale, la surexpression d'HBSP pourrait contribuer à la mobilité et à l'invasion cellulaire et donc à l'agressivité tumorale (470). Des évidences montrent qu'HBSP pourrait aussi moduler la réponse immunitaire contre HBV. Les variants épissés d'HBV sont associés à une résistance aux traitements par l'interféron, en particulier lors de l'expression de HBSP (460). De plus, HBSP semble limiter l'inflammation hépatique chez les souris, en modulant la voie de signalisation TNF $\alpha$  dépendante (471). Récemment, HBSP a été impliquée dans un phénomène de tolérance du foie aux dommages tels que la fibrose. La fibrose induite chimiquement chez des souris transgéniques exprimant HBSP a permis de mettre en évidence l'effet protecteur d'HBSP, qui inhibe le recrutement de la chimiokine pro-inflammatoire CCL2. Ce phénomène a été confirmé *in vitro* et corrélé à la détection des variants d'épissage d'HBV chez les patients infectés chroniquement (472).

Ainsi, les protéines codées par les transcrits épissés d'HBV sont potentiellement des éléments importants de la régulation de la pathogenèse d'HBV. Cependant, le rôle de ces ARN épissés dans la pathologie associée à HBV et sa progression reste encore à préciser. Un grand nombre de transcrits épissés ne semblent pas coder pour des protéines et pourraient représenter des ARN non codants pouvant exercer des rôles de régulation. Il est aussi possible qu'une grande partie de ces ARN épissés soient générés du fait de l'incapacité du virus à bloquer les phénomènes d'épissage. De nombreuses RBP pourraient participer au métabolisme des ARNm épissés et non épissés du virus de l'hépatite B. L'identité de ces facteurs et leur mode de recrutement par le virus restent à déterminer.



# OBJECTIFS DE RECHERCHE

Les propriétés d'auto-assemblage de la protéine HBc sont essentielles lors la formation des nucléo-capsides dans le cytoplasme des cellules infectées (287). HBc intervient aussi dans l'adressage des nucléocapsides vers le noyau lors des étapes précoces et tardives de l'infection (354). Ces fonctions cytoplasmiques essentielles constituent la cible des nouvelles stratégies thérapeutiques antivirales prometteuses, notamment celles qui ont résulté dans le développement des CAM (322).

De façon intéressante, HBc est aussi présente dans le noyau et cela dès les étapes précoces de l'infection. Elle est en effet libérée dans le noyau en même temps que le génome viral, suite au passage des nucléocapsides à travers les pores nucléaires (386) et, plus tardivement, la protéine HBc néo-synthétisée peut être importée dans le noyau grâce à sa séquence NLS. La présence d'HBc dans le noyau est aussi attestée de façon indirecte par la présence dans sa séquence protéique de plusieurs signaux de type NES qui lui permettent de naviguer vers le cytoplasme en s'associant à des transporteurs spécifiques (355,473).

Différentes études ont montré que, dans le noyau, HBc s'associe à l'ADNccc ainsi qu'aux régions promotrices des gènes cellulaires et pourrait ainsi réguler leur transcription (356,420). De plus, HBc possède la capacité de se lier aux ARN et pourrait donc intervenir dans le métabolisme des ARN viraux et/ou cellulaires (433). Ces données suggèrent qu'HBc possède un rôle de régulation important dans le noyau des hépatocytes infectés. Cette hypothèse est aussi confortée par l'observation que, lors de l'évolution de l'infection chronique par HBV, la localisation intra-cellulaire d'HBc semble varier avec une présence majoritairement nucléaire lors des phases asymptomatiques et, à l'inverse, majoritairement cytoplasmique, lors des phases associées à une inflammation hépatique (415,416).

L'objectif de ce travail de thèse a été de caractériser les fonctions nucléaires d'HBc en identifiant ses partenaires dans le noyau des hépatocytes humains et en déterminant leur rôle dans la réplication du virus de l'hépatite B. Les résultats de cette étude nous permettent dès à présent d'émettre des hypothèses quant au rôle d'HBc dans le noyau de l'hépatocyte. Ils fournissent aussi des bases pour le développement de nouvelles stratégies antivirales.

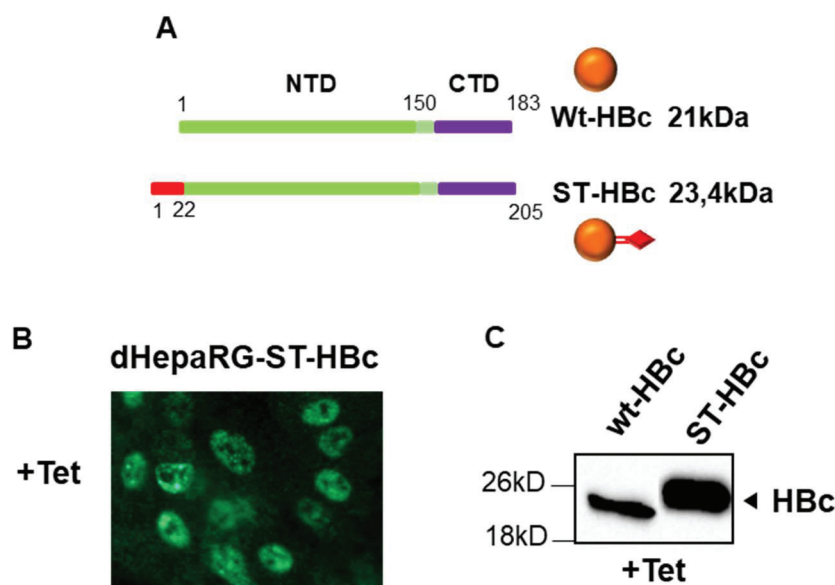
# RESULTATS

## I- Analyse protéomique des partenaires nucléaires d'HBc

### I.1. Identification des protéines associées à l'HBc nucléaire

Pour purifier les complexes nucléaires associés à HBc nous avons utilisé une lignée d'hépatocytes (cellules HepaRG) exprimant une protéine HBc chimérique composée d'un peptide de liaison à la streptavidine (Strep-Tag ou ST), fusionné à l'extrémité 5' de l'ORF d'HBc (ST-HBc) (Figure 24A). En guise de contrôle, nous avons utilisé une lignée HepaRG exprimant la protéine HBc sauvage (wt-HBc) (Figure 24A). Les deux cassettes ST-HBc ou wt-HBc ont été placées sous le contrôle du même promoteur inductible à la tétracycline (Tet).

L'expression et la localisation du ST-HBc produit par la lignée HepaRG-ST-HBc a été contrôlé par Western et blot immunofluorescence (IF) en utilisant un anticorps anti-HBc. Après induction à la Tet, la protéine ST-HBc est détectée principalement dans le noyau des cellules HepaRG-ST-HBc différenciées (Figure 24B). Comme



**Figure 24. Caractérisation de la lignée HepaRG-TR-ST-HBc.**

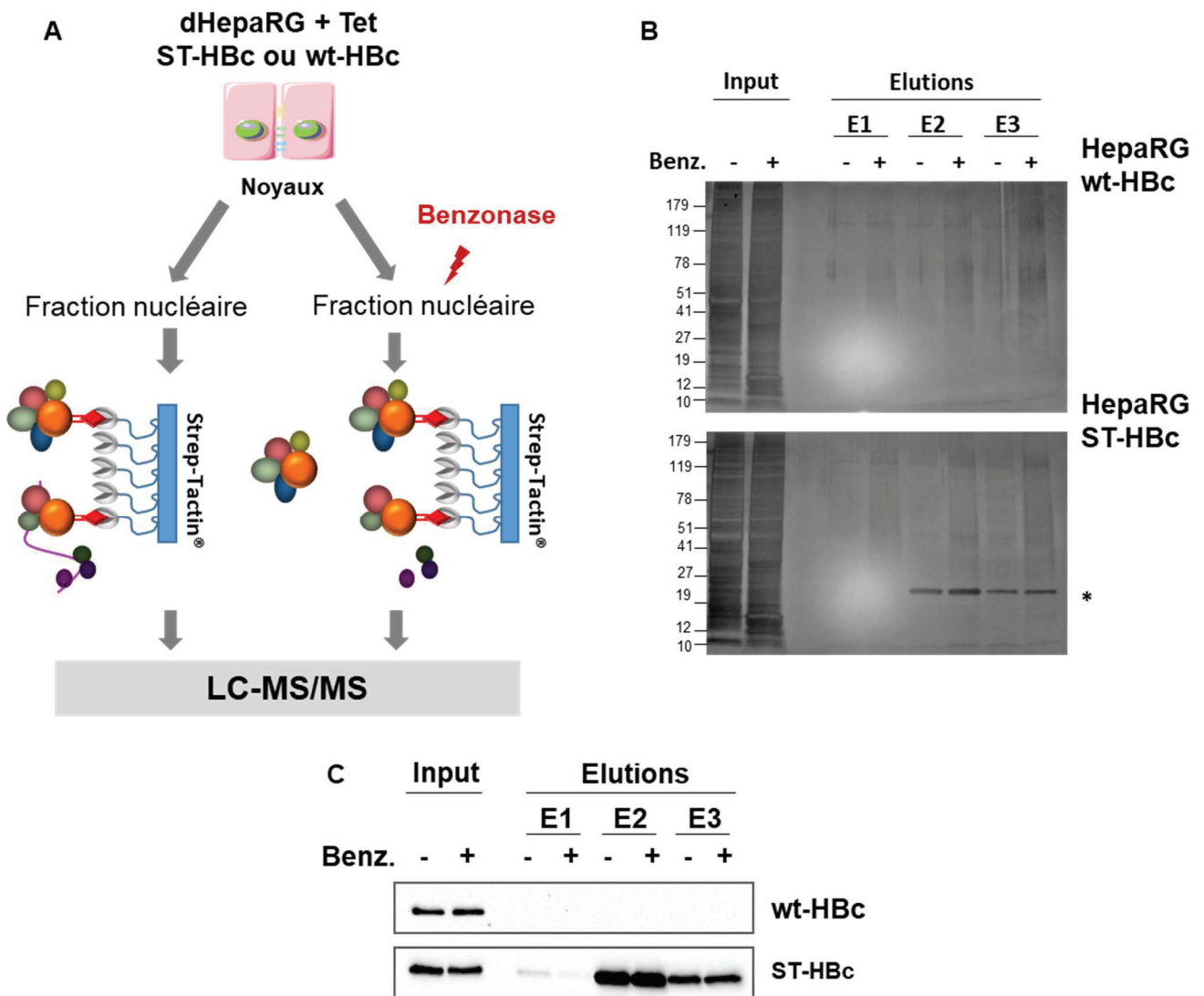
(A) Des cellules HepaRG différenciées (dHepRG) exprimant soit la protéine HBc sauvage (wt-HBc) soit la protéine HBc fusionnée à l'étiquette Strep-Tag en N terminal (ST-HBc) ont été utilisées. L'expression et la localisation de la protéine ST-HBc ont été contrôlées par IF (B) avec un anticorps anti-HBc dans les cellules dHepaRG induites à la tétracycline (+Tet) pendant 48h et par Western bot (C) L'expression de l'HBc et du ST-HBc a été contrôlée par Western blot pour chaque lignée.

attendu, la protéine chimérique HBc présente un poids moléculaire légèrement supérieur à l'HBc sauvage, du fait de l'ajout du ST (Figure 24C). Le ST-HBc est donc exprimé dans les cellules HepaRG et présente une localisation cohérente avec celle connue pour l'HBc sauvage, ce qui valide son utilisation pour les expériences suivantes.

Afin de purifier les complexes protéiques associés à ST-HBc, les cellules HepaRG-ST-HBc et HepaRG-wt-HBc ont été différenciées (dHepaRG) puis induites à la Tet pendant 48h. Les noyaux de chaque lignée ont été purifiés puis traités ou non par une nucléase, la benzonase, permettant d'éliminer les protéines associées au ST-HBc *via* des acides nucléiques. Les complexes nucléaires associés au ST-HBc ont été ensuite purifiés sur des colonnes de Strep-Tactin®, un analogue de la streptavidine permettant la fixation du Strep-tag avec une haute affinité (Figure 25A). Après élution avec une solution contenant de la desthiobiotine, la qualité des complexes nucléaires purifiés et l'efficacité de purification ont été analysées sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE coloré au nitrate d'argent et par Western blot (Figure 25B et C). Comme attendu, le profil en nitrate d'argent des complexes purifiés est très différent de celui des extraits nucléaires avant purification (Figure 25B, Elutions vs Input) et ne change pas significativement en présence de benzonase. De plus, une bande correspondant à la protéine HBc est retrouvée uniquement dans les éluions provenant des noyaux de dHepaRG-ST-HBc et pas dans les éluions « contrôle » réalisées à partir d'extraits nucléaires de cellules dHepaRG-wt-HBc (Figure 25B).

C'est en particulier dans la deuxième élution que l'enrichissement du ST-HBc est le meilleur (Figure 25B et C, E2 vs E1 et E3). Cette fraction a donc été utilisée pour l'analyse protéomique (chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse en tandem ou nanoLC-MS/MS). La purification des complexes associés à ST-HBc suivie de l'analyse protéomique a été répétée trois fois sur trois lots indépendants de cellules dHepaRG.

L'identification des peptides et des protéines, les analyses statistiques et les niveaux d'enrichissement des protéines présentes dans les complexes associés à ST-HBc ont été réalisées à l'aide des logiciels MaxQuant et ProStar. Ainsi, 228 protéines totales ont été retrouvées associées à ST-HBc en l'absence de traitement par la benzonase et 270 en présence de benzonase. Le nombre plus important de protéines

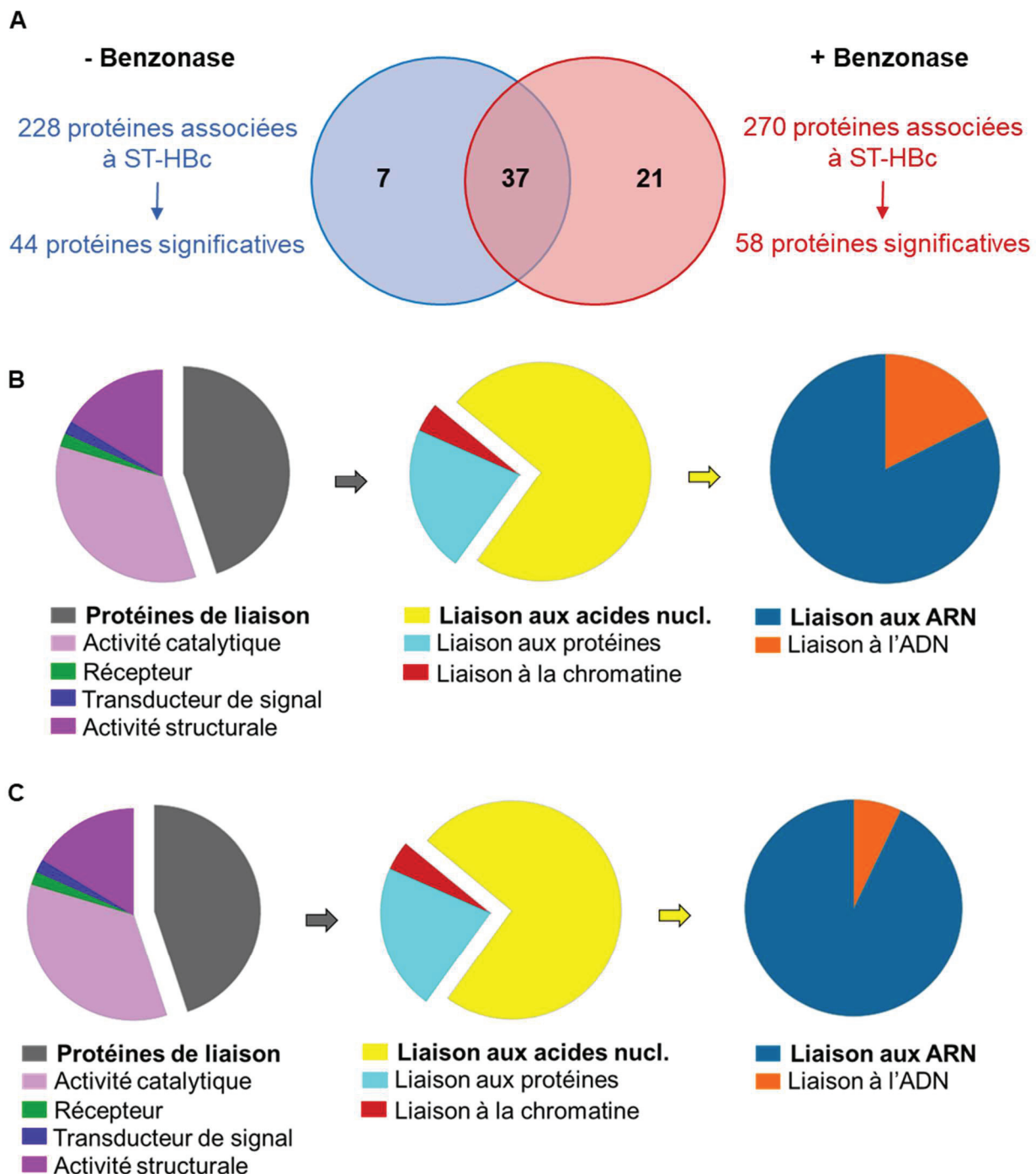


**Figure 25. Purification des complexes protéiques associés à ST-HBc.**

(A) Les noyaux des cellules dHepaRG exprimant wt-HBc ou ST-HBc ont été extraits, lysés puis traités ou non par une nucléase (benzonase ou Benz.). Les protéines ST-HBc ont été purifiées à partir des fractions nucléaires par passage sur des colonnes de Strep-Tactin®. Après plusieurs lavages, les ST-HBc et protéines associées ont été élués trois fois par la desthobiotine. L'éluion n°2 a été analysée par spectrométrie de masse (LC-MS/MS). La purification a été répétée trois fois avec trois lots différents de dHepaRG. L'enrichissement en ST-HBc dans chacune des trois éluions (E1, E2, E3) a été contrôlé par (B) coloration au nitrate d'argent et (C) Western blot, en comparaison avec la fraction nucléaire chargée sur la colonne (Input). Pour le Western blot, un anticorps primaire anti-HBc a été utilisé.

retrouvées en présence de benzonase s'explique par le fait que son action entraîne une solubilisation des complexes protéiques associés à la chromatine, qui sont alors récupérés dans la fraction nucléaire analysée par spectrométrie de masse alors que, sans traitement, les facteurs associés à la chromatine sont éliminés lors des étapes de centrifugation réalisées après la lyse des noyaux. En appliquant des filtres rigoureux de p-value (<0,005) et de score d'enrichissement (>4), nous avons pu

identifier 44 et 58 protéines significativement associées à ST-HBc en absence ou présence de benzonase, respectivement. Parmi celles-ci 37 protéines sont retrouvées en commun dans les deux conditions (Figure 26A).



**Figure 26. Analyse statistique et bioinformatique des partenaires de ST-HBc.**

(A) Répartition des partenaires nucléaires de ST-HBc en fonction de la présence ou non de benzonase. Le nombre de partenaires significativement associés au ST-HBc a été sélectionné sur la base d'une p-value < 0,005 et d'un score d'enrichissement > 4. (B) et (C) Analyse par Gene Ontology (GO – Panther) des fonctions moléculaires des 58 et 37 protéines significativement associées à ST-HBc (B) en présence de benzonase ou (C) communes aux conditions sans et avec benzonase, respectivement.

## I.2. Analyse des catégories fonctionnelles des partenaires de ST-HBc

Les partenaires nucléaires de ST-HBc identifiés dans l'étude protéomique ont été analysés par Gene Ontology sur la base de leurs fonctions moléculaires. Parmi les 58 protéines identifiées en présence de benzonase (Figure 26B), les fonctions les plus représentées sont celles de protéines de liaison (38%), suivies par des protéines à activité catalytique (29%), des protéines structurales (14%) et enfin des récepteurs et des transducteurs de signal. Parmi les protéines de liaison, la grande majorité sont des protéines de liaison aux acides nucléiques (77%) et en particulier des protéines de liaison aux ARN (82%). Ce profil de répartition des voies biologiques, avec une majorité de protéines de liaison aux acides nucléiques et en particulier aux ARN, est également retrouvé en prenant en compte uniquement les 37 partenaires de ST-HBc communs aux conditions avec ou sans benzonase (Figure 26C).

Grâce à l'analyse des termes GO des partenaires de ST-HBc nous avons donc pu déterminer que la majorité de ces facteurs sont des protéines de liaisons aux ARN

GO biological process complete	#	# expected	Fold Enrichment	+/-	P value
mRNA splice site selection	26	5	.05	> 100	+ 1.05E-05
↳spliceosomal complex assembly	54	5	.10	52.48	+ 3.91E-04
↳mRNA splicing, via spliceosome	284	11	.50	21.95	+ 1.47E-08
positive regulation of RNA splicing	28	4	.05	80.97	+ 1.72E-03
↳regulation of RNA splicing	110	7	.19	36.07	+ 8.32E-06
↳regulation of gene expression	4544	21	8.02	2.62	+ 3.08E-02
regulation of alternative mRNA splicing, via spliceosome	39	4	.07	58.13	+ 6.39E-03
↳regulation of mRNA splicing, via spliceosome	72	5	.13	39.36	+ 1.61E-03
↳regulation of mRNA processing	104	5	.18	27.25	+ 9.73E-03
↳regulation of mRNA metabolic process	135	5	.24	20.99	+ 3.45E-02
SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	94	6	.17	36.18	+ 1.42E-04
↳cotranslational protein targeting to membrane	100	6	.18	34.01	+ 2.04E-04
↳protein targeting to membrane	162	6	.29	20.99	+ 3.42E-03
viral transcription	113	6	.20	30.10	+ 4.19E-04
↳viral gene expression	124	6	.22	27.43	+ 7.21E-04
↳symbiosis, encompassing mutualism through parasitism	789	10	1.39	7.18	+ 6.59E-03
↳interspecies interaction between organisms	791	10	1.40	7.17	+ 6.74E-03
nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	119	6	.21	28.58	+ 5.67E-04
↳nuclear-transcribed mRNA catabolic process	197	6	.35	17.26	+ 1.06E-02
↳mRNA catabolic process	210	6	.37	16.19	+ 1.52E-02
↳negative regulation of gene expression	1597	14	2.82	4.97	+ 2.11E-03
translational initiation	143	6	.25	23.78	+ 1.66E-03
↳translation	385	7	.68	10.31	+ 3.79E-02
rRNA processing	257	7	.45	15.44	+ 2.63E-03
↳ribosome biogenesis	317	7	.56	12.52	+ 1.06E-02
↳rRNA metabolic process	284	7	.50	13.97	+ 5.11E-03
↳ncRNA metabolic process	552	9	.97	9.24	+ 3.28E-03
↳ncRNA processing	393	9	.69	12.98	+ 1.87E-04

**Figure 27. Analyse bioinformatique des partenaires nucléaires d'HBc.**

Parmi les 37 protéines associées à ST-HBc en présence ou non de benzonase, 11 sont impliquées dans l'épissage des ARNm via le spliceosome (entourées en rouge) et certaines sont aussi présentes dans les termes entourés en vert.

impliqués dans le métabolisme des ARN. Une analyse plus précise a permis de déterminer que parmi les 37 protéines communes aux conditions avec ou sans benzonase, la voie biologique la plus largement représentée est constituée par l'épissage des ARNm *via* le spliceosome. Les 11 protéines appartenant à cette voie sont impliquées dans la sélection des sites d'épissage et la régulation de l'épissage constitutif et alternatif (Figure 27). Ces 11 protéines comptent une majorité de protéines SR (SRSF1, 2, 5, 10, TRA2A et TRA2B), deux protéines LUC7-like relatives aux protéines SR (LUC7L2 et 3), deux protéines hnRNP (hnRNPA0 et RBMX), et une hélicase (DDX17).

Afin de préciser l'importance de la voie biologique « épissage des ARNm *via* le spliceosome » parmi les facteurs associés à ST-HBc, nous sommes partis de ces 11 protéines dites « initiatrices » pour rechercher, dans les bases de données, leurs interactants directs (1<sup>er</sup> niveau d'interaction) et identifier ceux retrouvés dans le protéome ST-HBc, indépendamment de leur significativité et leur condition de purification (avec ou sans benzonase) (Figure 28A). Cette première analyse a permis de montrer que 27 facteurs connus pour interagir avec ces 11 protéines « initiatrices » étaient également retrouvés parmi les partenaires du ST-HBc. Une analyse séquentielle nous a permis par la suite de regarder parmi les facteurs interagissant avec ces 11 protéines au 2<sup>ème</sup> puis 3<sup>ème</sup> niveau d'interaction, combien étaient aussi présents dans le protéome ST-HBc (Figure 28B). Dans l'ensemble, 115 protéines du protéome ST-HBc ont pu être connectées, directement ou indirectement, aux 11 protéines initiatrices. Environ la moitié de ces protéines (52/115) interviennent dans l'épissage des ARNm *via* le spliceosome.

Le score d'enrichissement des protéines associées à ST-HBc a permis d'évaluer leur niveau de représentation dans la condition dHepaRG-ST-HBc en comparaison avec la condition « contrôle ». De toutes les protéines identifiées, SRSF10 possède le score d'enrichissement le plus élevé, avec une valeur autour de 2700 que ce soit en présence ou non de benzonase. Parmi les 11 partenaires de ST-HBc impliqués dans l'épissage des ARNm *via* le spliceosome, SRSF10, TRA2B, LUC7L2, TRA2A, LUC7L7, SRSF2, et DDX17 présentent les mêmes scores d'enrichissement en présence ou non benzonase, suggérant qu'ils sont présents dans les complexes

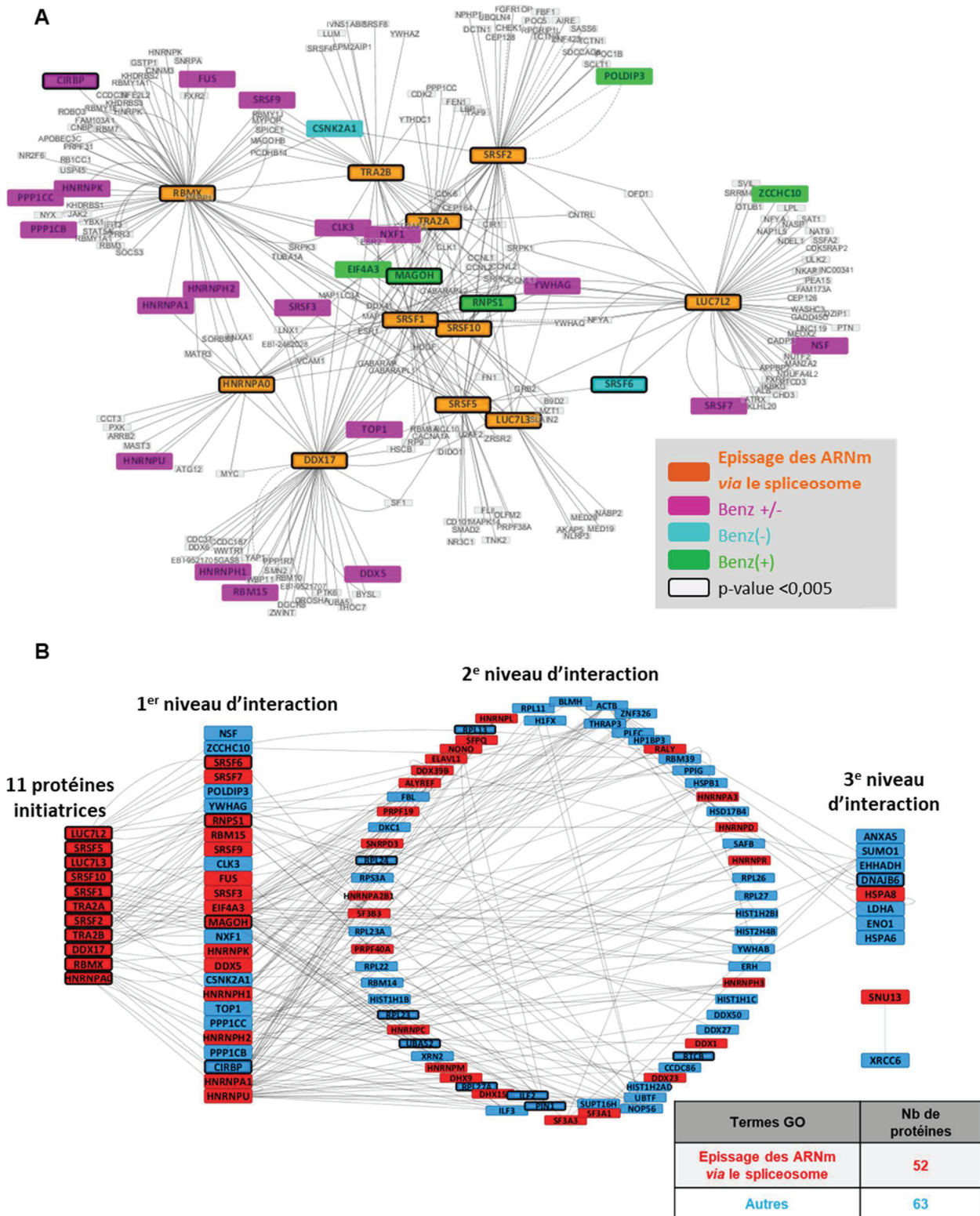
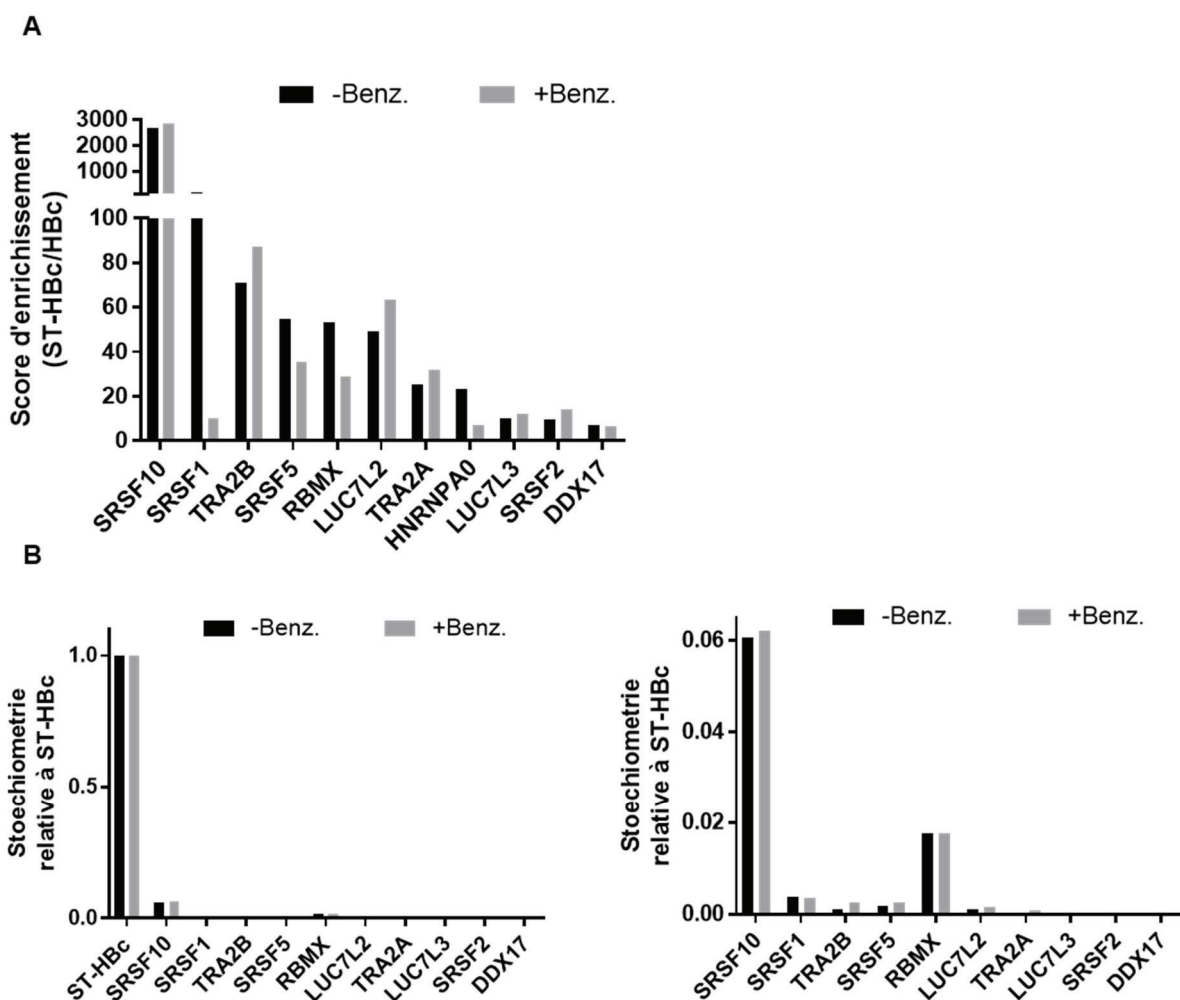


Figure 28. Réseaux d'interaction entre les 11 protéines « initiatrices » impliquées dans l'épissage des ARNm via le spliceosome, et l'ensemble des protéines identifiées dans le protéome d'Hbc.

Parmi les 37 protéines associées à ST-Hbc communes aux conditions avec ou sans benzonase, 11 sont impliquées dans l'épissage de ARN via le spliceosome. (A) Interactome construit à partir des 11 protéines dites « initiatrices ». Parmi les facteurs connus pour interagir avec ces 11 protéines initiatrices, ceux retrouvés dans le protéome d'Hbc sont indiqués avec des codes couleur. (B) Facteurs associés au ST-Hbc connus pour interagir avec les 11 protéines initiatrices du 1er au 3ème niveau d'interaction.



protéiques associées à ST-HBc, indépendamment de la présence d'acides nucléiques (Figure 29A). En revanche, SRSF1 présente un score d'enrichissement élevé, d'environ 190, qui tombe à 10 après traitement par la benzonase suggérant qu'au contraire cette protéine est majoritairement liée à HBc par l'intermédiaire d'acides nucléiques. Concernant SRSF5, RBMX et hnRNPA0, leur score diminue légèrement en présence de benzonase, ce qui suggère que ces trois protéines sont présentes dans les complexes protéiques associés à HBc mais sont aussi liées à HBc par l'intermédiaire d'acides nucléiques. Le niveau de représentation des protéines identifiées dans les complexes associés à HBc est donc assez variable, et pour certaines d'entre elles, dépendant de la présence d'acides nucléiques.



**Figure 29. Enrichissement et stœchiométrie des 11 protéines « initiatrices » dans les complexes associés à ST-HBc.**

(A) Scores d'enrichissement des 11 protéines dites « initiatrices » dans les complexes associés à ST-HBc, en présence ou non de benzonase (B) Stœchiométrie des 11 protéines initiatrices exprimée relativement à ST-HBc.

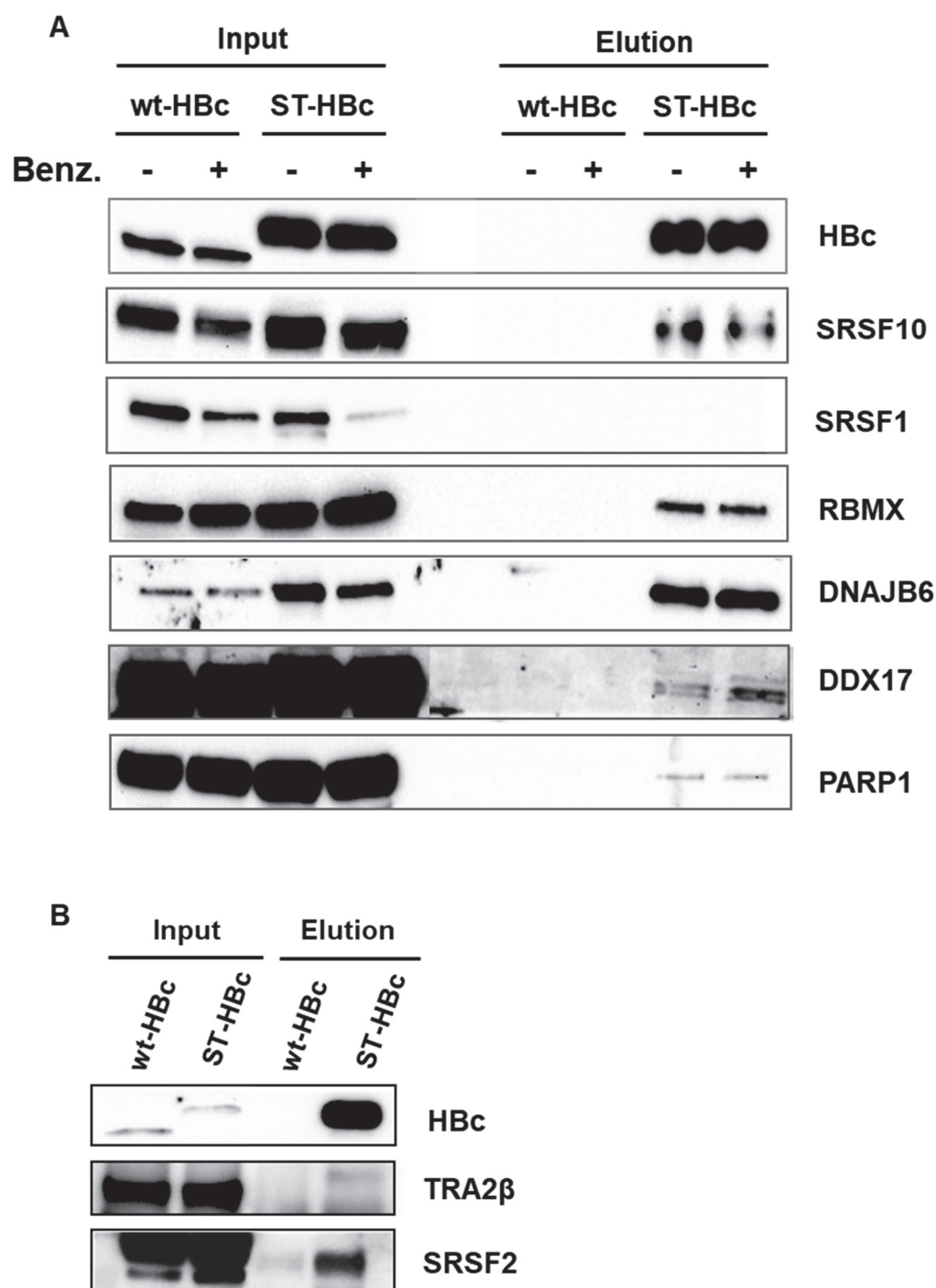
Concernant la stœchiométrie de ces facteurs par rapport à la quantité de ST-HBc détectée (Figure 29B), on trouve un rapport de 0,06 et 0,02 pour SRSF10 et RBMX, respectivement. Cela signifie que, dans l'échantillon analysé, la protéine ST-HBc était environ 17 et 50 fois plus enrichie que SRSF10 et RBMX, respectivement. Les autres protéines initiateuses sont présentes avec un rapport inférieur à 0,001 pour une protéine ST-HBc. Ces ratios soulignent l'importance de l'interaction de ST-HBc avec SRSF10 et dans une moindre mesure avec RBMX, par rapport aux autres facteurs.

En conclusion, ces analyses *in silico* ont permis de déterminer que, dans un contexte non infectieux, la protéine HBc interagirait préférentiellement avec les protéines de liaison aux ARN et, en particulier, avec des facteurs impliqués dans l'épissage des ARNm *via* le spliceosome. Deux facteurs en particulier, SRSF10 et RBMX, appartenant à deux familles majeures de RBP, les protéines SR et hnRNP, ont été identifiés parmi les protéines les plus enrichies dans les complexes associés au SR-HBc.

### I.3. Etudes de validation

#### ***1.3.1. Détection par Western blot des partenaires de ST-HBc dans les complexes purifiés***

La présence de certains facteurs identifiés dans les complexes ST-HBc a été validée par Western blot (Figure 30). Comme attendu, les protéines SRSF10, SRSF1, RBMX, DDX17, DNAJB6 et PARP1 sont détectées dans les extraits nucléaires des lignées wt-HBc et ST-HBc en présence ou non de benzonase. Après purification, toutes ces protéines sauf SRSF1 sont détectées uniquement dans la fraction purifiée issue des cellules dHepaRG-ST-HBc. Ces résultats confirment leur présence dans les complexes associés à ST-HBc. Conformément aux résultats de spectrométrie de masse (Figure 29A), SRSF1 n'est pas détectée dans les extraits purifiés après traitement par la benzonase (Figure 30A). Cependant, l'absence de détection de cette protéine dans les complexes purifiés en l'absence de benzonase est plus surprenante. Cela pourrait être dû à sa présence dans ces extraits en très faible quantité. Des validations ultérieures réalisées sur des extraits nucléaires traités à la benzonase et



**Figure 30. Détection par Western blot des partenaires de ST-HBc dans les extraits purifiés.**

(A) Les extraits nucléaires de cellules dHepaRG-ST-HBc ou wt-HBc induit à la tétracycline et traités ou non par la benzonase (benz) ont été analysés par Western blot avant (input) ou après (élution) la purification sur les colonnes de Strep-Tactin®. (B) Des extraits nucléaires de cellules dHepaRG-ST-HBc induites à la tétracycline et traités par la benzonase ont été analysés par Western blot avant ou après la purification sur des billes Strep-Tactin®. Les anticorps utilisés pour la détection d'HBc et des autres protéines cellulaires sont décrits dans la section matériel et méthodes.

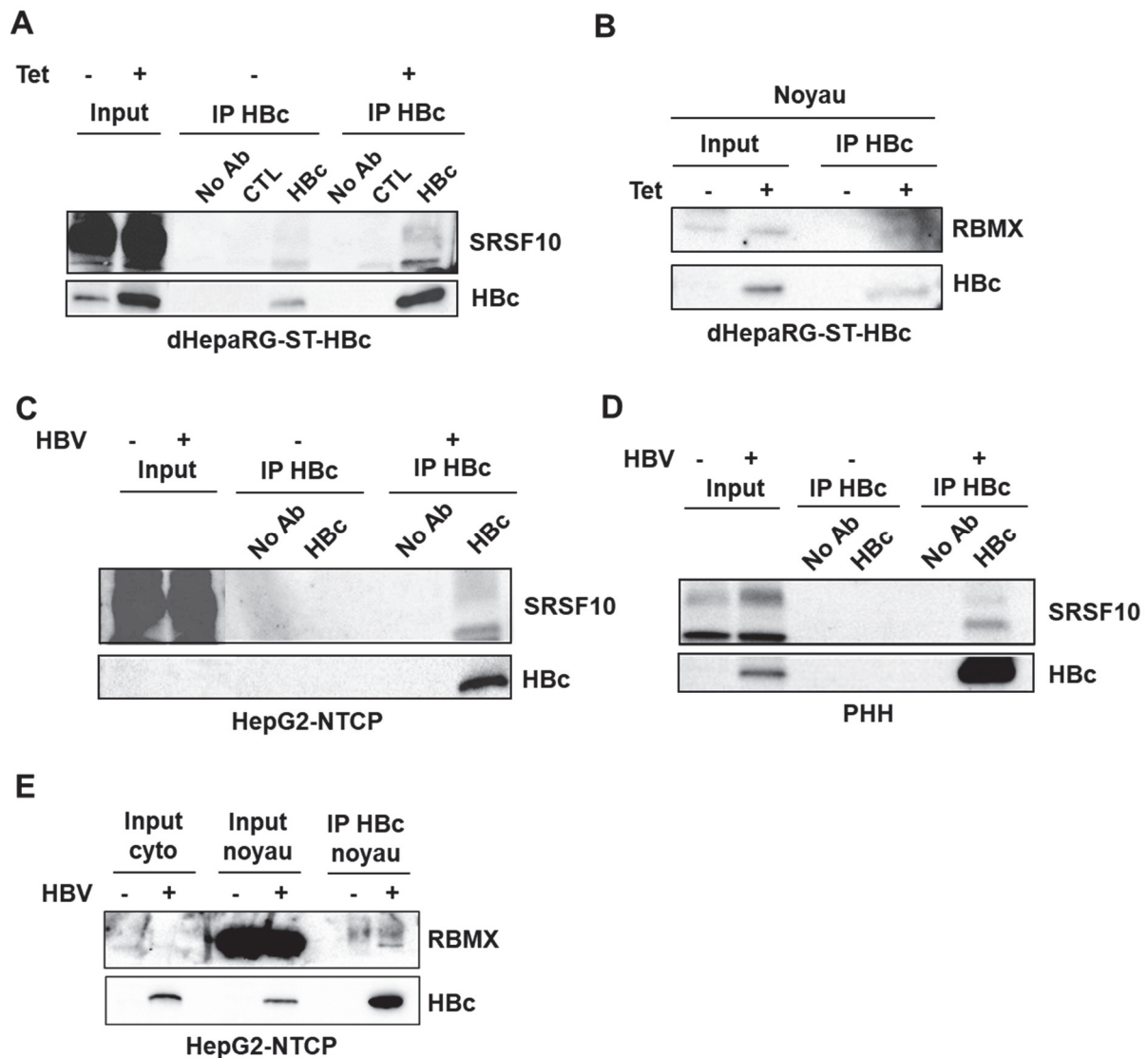
purifiés sur des billes de streptactine ont permis de confirmer également la présence de TRA2 $\beta$  et SRSF2 dans les complexes associés au ST-HBc (Figure 30B).

### ***1.3.2. Interaction entre HBc et ses partenaires nucléaires***

Afin de confirmer l'interaction entre la protéine HBc et les protéines identifiées dans l'analyse protéomique, nous avons par la suite cherché à mettre en évidence ces interactions dans des modèles de cellules infectées par HBV. En particulier, nous nous sommes intéressés à l'interaction entre HBc et SRSF10 ou RBMX, qui sont respectivement la protéine SR et la hnRNP les plus représentées dans les complexes ST-HBc.

Pour cela il a été nécessaire de mettre au point l'immunoprécipitation (IP) d'HBc avec un anticorps spécifique. Pour valider cette technique nous avons d'abord utilisé des extraits totaux de cellules HepaRG-ST-HBc pour réaliser l'IP avec un anticorps anti-HBc. La détection d'HBc par Western blot a permis d'établir que ST-HBc était bien détecté dans les extraits totaux après induction à la Tet (Figure 31A). La détection du ST-HBc en l'absence de Tet témoigne d'une légère fuite du promoteur utilisé pour exprimer ST-HBc (Figure 31A). Après IP, ST-HBc est détecté uniquement en présence de l'anticorps anti-HBc, très faiblement en l'absence de Tet, et fortement en présence de l'antibiotique. Les isoformes hautes et basses de SRSF10 (38 et 20 kD respectivement) ont été détectées dans les extraits totaux avant IP et après IP, avec l'anti-HBc. Les quantités de ST-HBc immunoprécipité étant très faible en l'absence de Tet, il est normal de ne pas détecter la forme haute de SRSF10 déjà faible avant IP. En revanche, les deux formes de SRSF10 sont bien détectées en présence de Tet. De même, l'IP d'HBc a permis de détecter la présence de RBMX dans ces mêmes extraits (Figure 31B). Ces deux expériences ont permis de valider la technique d'IP et de confirmer la possibilité de co-immunoprécipiter SRSF10 et RBMX avec un anticorps anti-HBc.

Par la suite, nous avons cherché à déterminer si ces mêmes complexes peuvent être détectés dans des hépatocytes infectés par HBV. Pour cela, nous avons utilisé des extraits provenant soit de cellules HepG2-NTCP soit de PHH (hépatocytes primaires humains) infectés avec HBV. En effet, ces deux types cellulaires peuvent



**Figure 31. Co-immunoprécipitation de SRSF10 et RBMX avec un anticorps anti-HBc.**

(A) Des cellules dHepaRG ST-HBc ont été induites ou non à la Tet pendant 48h puis les extraits totaux ont été soumis à une immunoprécipitation en utilisant un anticorps anti-HBc, un IgG contrôle (CTL), ou aucun anticorps (No Ab). (B) De la même façon, l'IP a été réalisée sur les extraits nucléaires des cellules dHepaRG-ST-HBc en utilisant un anticorps anti-HBc. (C-D) Co-immunoprécipitation de SRSF10 par l'ant-HBc à partir d'extraits totaux de cellules HepG2-NTCP (C) ou d'hépatocytes primaires humaines (PHH) infectées par HBV(D). (E) Co-immunoprécipitation de RBMX par l'anti-HBc à partir des extraits nucléaires de cellules HepG2-NTCP. Les protéines éluées ont été analysées par Western blot en utilisant un anticorps primaire anti-HBc, SRSF10 ou RBMX comme indiqué.

être infectés avec une efficacité supérieure à 50% des cellules ce qui n'est pas le cas des cellules dHepaRG. Les extraits totaux provenant de cellules infectées ou contrôle ont été soumis à une IP anti-HBc puis analysés par Western blot. Dans les cellules HepG2-NTCP, HBc n'est détectable qu'après IP probablement à cause de sa faible concentration dans les extraits initiaux (Figure 31C). Les formes hautes et basses de

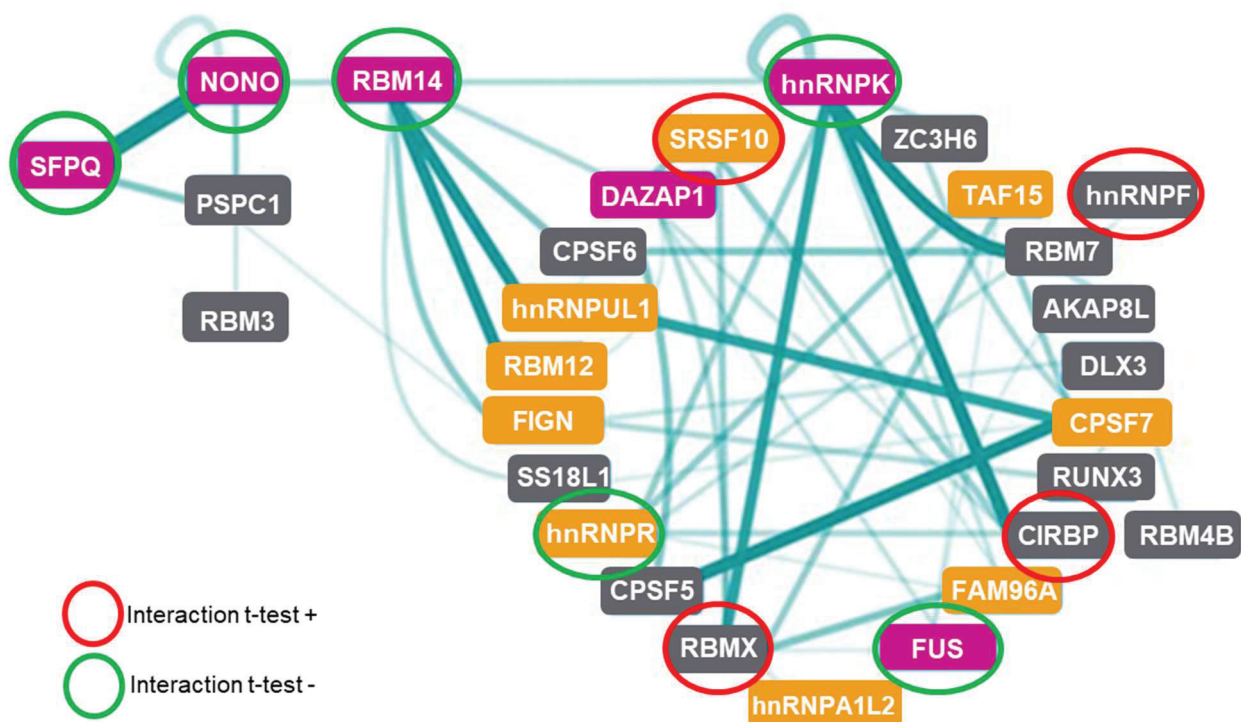
SRSF10 sont détectées dans les extraits non purifiés qu'ils soient infectés ou pas, et après IP avec l'anti-HBc uniquement dans les extraits infectés (Figure 31C). Cette expérience complétée par l'IP réalisée dans des PHH (Figure 31D) a permis de confirmer l'interaction entre SRSF10 et HBc dans un contexte infectieux. De plus, l'interaction d'HBc avec RBMX a été aussi observée à partir d'extrait nucléaires de cellules HepG2-NTCP infectées par HBV (Figure 31E).

Pour déterminer si HBc et ses deux partenaires SRSF10 et RBMX, interagissent de façon directe, un test double hybride en levure a été réalisé (service sous-traité auprès de la société Creative Biolabs). Les ADNc codant pour HBc, SRSF10 et RBMX ont été clonés dans deux vecteurs d'expression « appât » et « proie », puis transfectés dans les levures qui ont été ensuite sélectionnées sur des milieux de cultures sélectifs. Aucun résultat positif n'a été observé (Annexe 1). Cela suggère que l'interaction entre HBc et RBMX ou SRSF10 pourrait être indirecte, par l'intermédiaire d'une ou plusieurs autres facteurs. Cependant, on ne peut exclure la possibilité d'une interaction directe entre HBc et SRSF10 ou RBMX qui dépendrait de modifications post-traductionnelles de ces protéines, absentes dans ce modèle de levure.

Dans la première partie de cette étude, le protéome d'HBc a mis en évidence l'importance des protéines de liaison à l'ARN, en particulier celles impliquées dans l'épissage *via* le spliceosome, parmi les partenaires potentiels de la protéine de capside d'HBV. Parmi les 11 facteurs les plus fortement associés à HBc, on trouve principalement des protéines SR et hnRNP, dont SRSF10 et RBMX. L'étude de l'interaction entre HBc et SRSF10 ou RBMX a permis de valider ces interactions dans un modèle infectieux. Des validations fonctionnelles ont donc par la suite été réalisées, afin de caractériser le rôle de ces facteurs dans l'infection par HBV.

## II- Validations fonctionnelles : rôle des partenaires nucléaires d'HBc dans l'infection par HBV

Dans le noyau, deux corps sub-nucléaires sont enrichis en RBP, les Speckles, qui sont mis en jeu lors des étapes d'épissage des ARNpré-m (474), et les Paraspeckles potentiellement impliqués dans le stockage de RBP et d'ARN en vue d'une réponse à un stress pour le second (18,19). Les Speckles sont des structures dynamiques dans lesquelles on retrouve de nombreuses protéines SR et notamment celles identifiées dans l'interactome d'HBc (SRSF1, 2, 5 et 10 ainsi que les protéines SR like TRA2 $\alpha$  et TRA2 $\beta$ ), et aussi des hnRNP (Figure 29). Les Paraspeckles sont aussi composés de RBP, dont la protéine SRSF10 et RBMX (Figure 32) (127) qui font partie des RBP les plus enrichies de notre protéome HBc.



**Figure 32. Interactome des protéines des Paraspeckles.**

L'interaction entre les protéines qui entrent dans la composition des Paraspeckles est représentée par les lignes dont l'épaisseur augmente avec le score d'interaction. Le code couleur indique l'importance de chaque protéine dans la formation des Paraspeckles (rose : protéine essentielle ; jaune : protéine importante ; gris : protéine non requise). Les protéines identifiées dans le protéome d'HBc sont entourées en rouge si elles sont significativement associées à HBc, en vert si elles ne le sont pas (adapté de 127).

Suite à ces observations nous avons donc cherché à déterminer si HBc pouvait se localiser dans les Speckles et/ou les Paraspeckles, ou à leur proximité notamment du fait de sa structure proche de celle des protéines SR, dans le but de recruter ou de séquestrer des constituants de ces corps nucléaires et ainsi favoriser la réplication d'HBV.

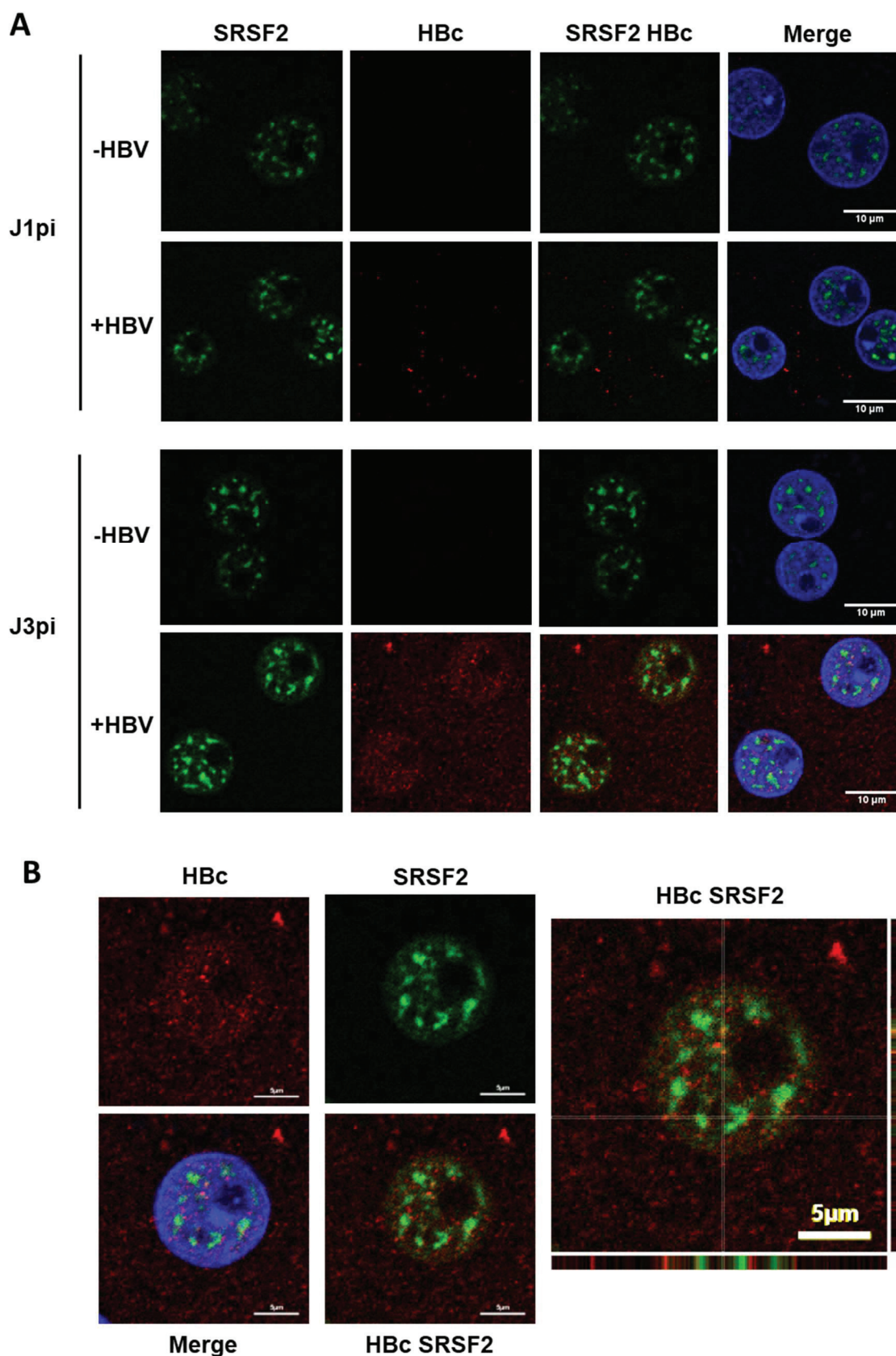
## II.1. Speckles, Paraspeckles et infection par HBV

### *II.1.1. Etude de la localisation d'HBc, des Speckles et des Paraspeckles*

Afin de déterminer si les Speckles sont impliqués dans l'infection par HBV, nous nous sommes d'abord demandés si la protéine HBc pouvait colocaliser à proximité ou au sein de ces structures. Pour répondre à cette question, des PHH ont été infectés par HBV et fixés 1 ou 3 jours après l'infection. Une analyse par immunofluorescence (IF) a été réalisée avec des anticorps anti-HBc, et anti-SRSF2 (ou SC35), ce dernier étant couramment utilisé pour marquer ce corps nucléaire (475). SRSF2/SC35 a d'ailleurs été identifié dans notre analyse protéomique comme un partenaire d'HBc (Figure 28 et 29). Les images obtenues montrent que trois jours après infection, la protéine HBc est détectée dans le noyau et qu'une fraction des signaux HBc colocalisent avec les signaux SRSF2 (Figure 33A et B). Cette distribution des signaux HBc et SRSF2 n'est pas modifiée à des temps plus tardifs après infection (données non montrées). On observe aussi que l'infection HBV n'affecte pas de façon visible l'organisation de ce corps nucléaire. Ces analyses suggèrent que l'infection par HBV n'altère pas la structure des Speckles, et qu'au moins une fraction d'HBc nucléaire se retrouve localisée à proximité des Speckles. Des expériences par PLA (Proximity Ligation Assay) ainsi que des mesures plus détaillées des niveaux de colocalisation des deux signaux observés par IF nous permettront de valider ultérieurement ces résultats.

Nous avons également analysé par IF la localisation intra-nucléaire d'HBc par rapport aux protéines des Paraspeckles, en particulier NONO, FUS, SFPQ et hnRNP-K qui sont des composants essentiels de ces corps sub-nucléaires (127) et qui ont été identifiés dans le protéome d'HBc. Ces RBP sont notamment impliquées dans la

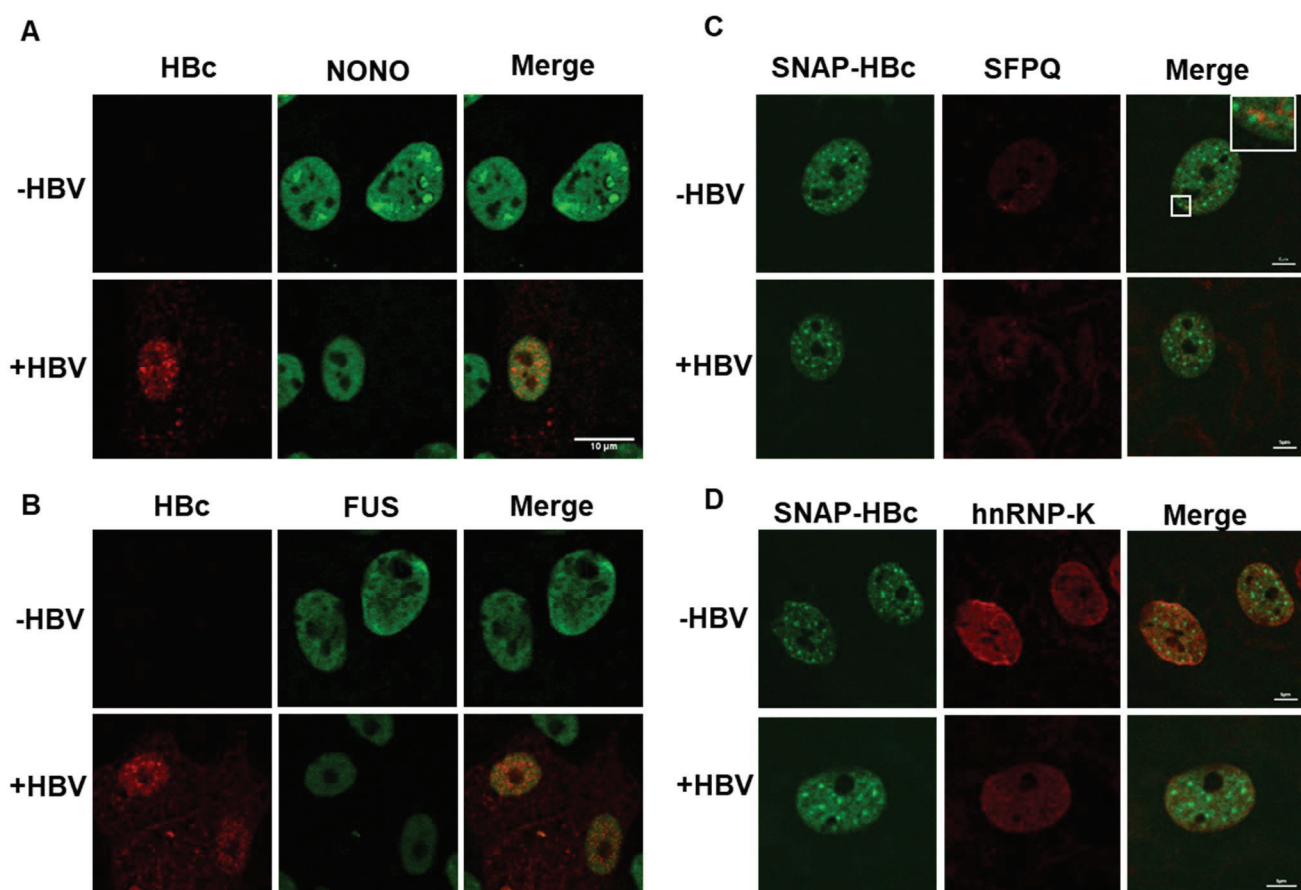




**Figure 33. Localisation d'HBc par rapport aux Speckles dans les PHH infectés par HBV.**

Des PHH ont été infectées ou non par HBV à une MOI de 100 vge/cellule pendant 16h, puis fixées à J1 ou J3 post-infection. Une IF a été réalisée au moyen d'anticorps anti-HBc et SRSF2. La coloration Hoechst a été utilisée pour marquer le noyau. Les images ont été acquises au microscope confocal en mode spectral (Zeiss780).

réponse aux dommages à l'ADN, lors d'un stress génotoxique ou d'une infection virale (20,135,201,207,271,476). Ces quatre protéines pourraient être mises en jeu lors de l'infection par HBV. Les marquages de NONO, FUS et hnRNP-K ont révélé une distribution intranucléaire diffuse de ces trois facteurs ne permettant pas de détecter spécifiquement des structures ponctuées typiques des Paraspeckles (Figure 34A, B et D). De ce fait, il est difficile de déterminer s'il y a une réelle colocalisation avec les signaux HBc, qui tout en étant plus ponctués, sont aussi répartis de façon homogène dans le noyau. Dans le cas de SFPQ le marquage obtenu est très faible mais ponctiforme et plus conforme à celui attendu pour un marquage des Paraspeckles (Figure 34C). Le co-marquage d'HBc (ici révélé par une coloration de la



**Figure 34. Localisation d'HBc par rapport aux protéines des Paraspeckles.**

(A) et (B) Des cellules dHepaRG ont été infectées ou non par HBV à une MOI de 250 vge/cellule pendant 16h puis fixées 7 jours après infection. Une IF a été réalisée pour déterminer la localisation des protéines HBc, NONO et FUS avec les anticorps primaires correspondants. (C) et (D) Des cellules dHepaRG exprimant la protéine chimérique SNAP-HBc ont été infectées ou non par HBV à une MOI de 250 vge/cellule pendant 16h puis fixées 7 jours après infection. Une IF a été réalisée pour déterminer l'expression et la localisation de SFPQ et hnRNP-K avec les anticorps primaires correspondants. Le SNAP-HBc a été détecté par marquage à l'Oregon-green. Les images ont été acquises au microscope confocal (Zeiss780).

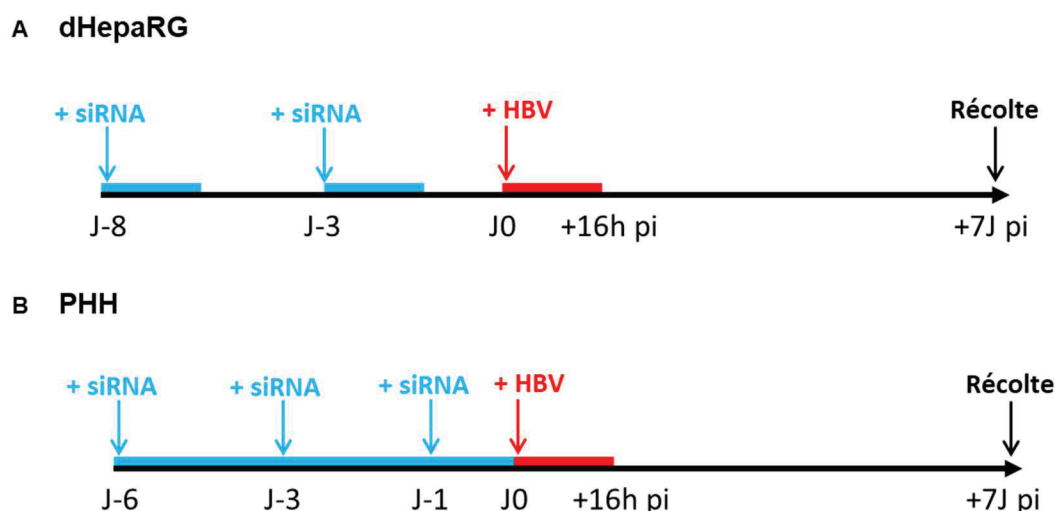
protéine SNAP-HBc par de l'Oregon-green) n'a pas permis de montrer de réelle colocalisation entre les signaux HBc et SFPQ mais seulement une proximité (Figure 34C). L'étude de la colocalisation entre HBc avec d'autres protéines identitaires des Paraspeckles, telle que PSPC, permettra de compléter ces analyses de colocalisation entre HBc et les composants ce corps nucléaire.

Dans l'ensemble, l'étude de la colocalisation d'HBc avec les protéines des Speckles montrent une colocalisation partielle d'HBc avec ces structures, suggérant qu'HBc pourrait recruter, interagir avec certains facteurs cellulaires des Speckles pour favoriser la réplication d'HBV.

### ***II.1.2. Rôle des protéines des Speckles et Parapackles dans l'établissement et la persistance de l'infection par HBV***

Afin de poursuivre l'étude du rôle des protéines des Speckles et Paraspeckles dans l'infection par HBV, nous avons voulu déterminer l'effet de l'inhibition de certaines de ces protéines sur l'établissement et la persistance d'HBV dans les hépatocytes. Cette analyse préliminaire s'est d'abord focalisée sur quelques représentant types de ces deux corps nucléaires, en particulier SRSF1, RBM14 et NONO, indépendamment de leurs niveaux de représentation dans le protéome d'HBc.

La protéine SRSF1 qui est considérée comme le prototype de la famille des protéines SR. Ainsi, malgré sa faible détection dans les complexes associés à ST-HBc après purification en présence de benzonase (Figure 29A et 30A), nous avons poursuivi les investigations sur cette protéine. L'effet de l'inhibition de SRSF1 par siRNA a été répété en dHepaRG, et testé en PHH, selon le protocole décrit dans la figure 35.

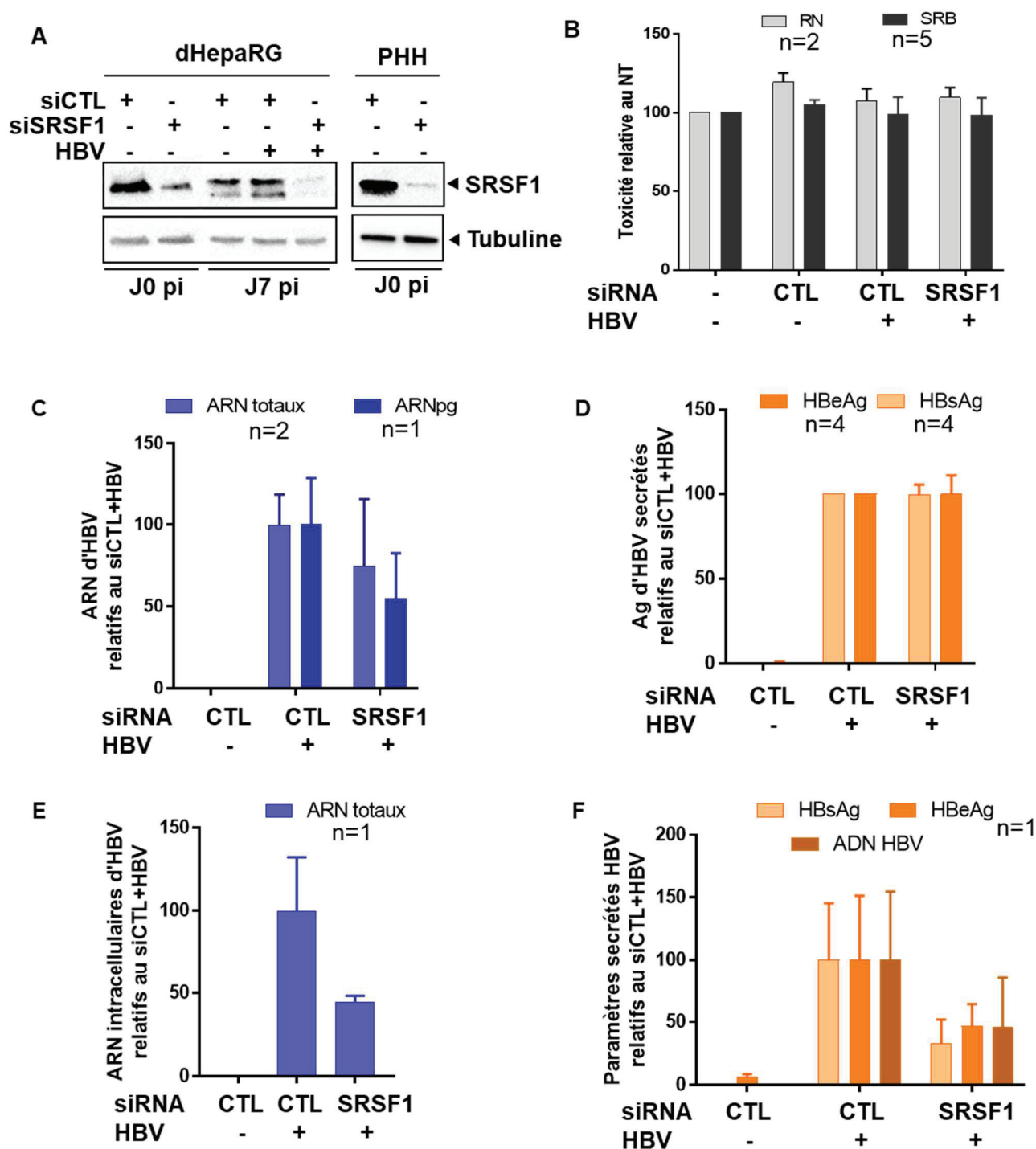


**Figure 35. Protocole de transfection des siRNA avant l'infection.**

Les siRNA ont été transfectés dans des cellules dHepaRG (A) ou PHH (B) qui ont été ensuite été infectées avec HBV pendant 16h. Les paramètres viraux ont été mesurés 7 jours après infection.

Un Western blot réalisé sur les extraits protéiques des cellules dHepaRG, récoltés à J0 et J7 post-infection (pi), nous a permis de confirmer l'efficacité de l'inactivation de SRSF1 par les siRNA (Figure R36A). De même l'analyse des extraits de PHH juste avant l'infection (J0) a montré que l'expression de SRSF1 est aussi efficacement inhibée. De plus, nous avons montré que la transfection par les siRNA n'induit pas de toxicité en comparaison des cellules non traitées, comme l'indiquent les tests au rouge neutre (RN) et à la sulforhodamine B (SRB) évaluant, respectivement, la viabilité et la densité cellulaire (Figure 36B).

L'analyse des paramètres viraux indique que l'inactivation de SRSF1 dans les dHepaRG résulte en une légère diminution du niveau en ARNpg (Figure 36C). Les niveaux en antigènes HBe et HBs, sécrétés dans le surnageant ne subissent en revanche pas de variations significatives suite à l'inactivation de SRSF1 (Figure 36D). Dans des PHH, l'absence de SRSF1 induit une diminution des ARN d'HBV d'environ 50% (Figure 36E), des antigènes viraux de 50 à 70% et des virions sécrétés de 50% en comparaison aux conditions CTL (Figure 36F). Malgré de fortes variations entre les triplicats biologiques d'une même condition, ces résultats suggèrent une activité provirale de SRSF1 qu'il faudra confirmer en répétant les expériences en PHH.

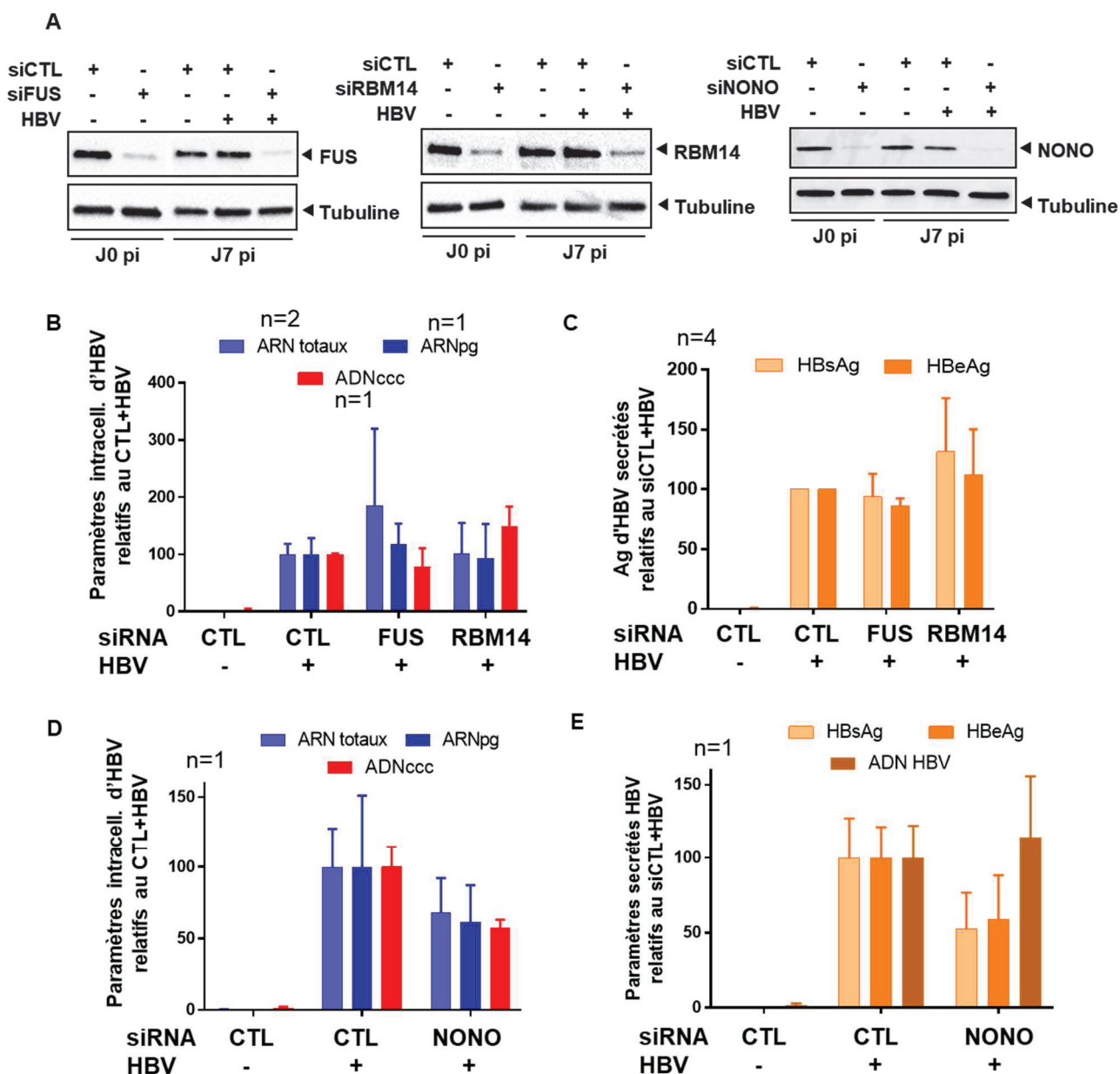


**Figure 36. Effet de l'inhibition de SRSF1 sur l'établissement et la persistance d'HBV.**

Des cellules dHepaRG (A,B,C,D) ou PHH (A,E,F) ont été transfectées par des siRNA ciblant SRSF1 ou des siRNA contrôles (CTL) puis infectées par HBV à une MOI de 250 ou de 100 vge/cellule, respectivement. (A) L'efficacité d'inactivation de SRSF1 a été évaluée par Western blot à J0pi et à J7pi sur les extraits cellulaires totaux. (B) La toxicité a été évaluée dans les cellules dHepaRG par RN et SRB à J7pi. Les ARN d'HBV ont été quantifiés par RT-qPCR à J7pi dans les extraits cellulaires totaux de dHepaRG (C) et PHH (E). Les antigènes HBs et HBe sécrétés dans le surnageant ont été quantifiés par ELISA à J7pi dans les dHepaRG (D) ou les PHH (F). (F) Le niveau en virions HBV sécrétés a été évalué en quantifiant les ADN HBV par qPCR dans le surnageant. n représente le nombre d'expériences indépendantes réalisées en triplicat.

En parallèle, pour préciser le rôle des facteurs composants les Paraspeckles, nous avons étudié plus précisément l'effet de l'inactivation de FUS, RBM14 et NONO sur l'établissement et la persistance d'HBV, grâce au même protocole. L'efficacité des siRNA contre ces trois facteurs a été évaluée par Western blot (Figure 37A). Que ce soit au moment de l'infection ou de la récolte, l'expression de ces 3 protéines est efficacement inhibée. Lors de l'inactivation de FUS, on n'observe pas de variations significatives des paramètres viraux intracellulaires ou extracellulaires (Figure 37B et C). Dans le cas de RBM14, l'ADNccc et les antigènes HBs et HBe subissent une légère augmentation (Figure 37B et C). Enfin, l'inactivation de NONO résulte en une diminution de la réplication virale visible au niveau intracellulaire (ARN et ADNccc) et extra-cellulaire (HBs et HBe) (Figure 37D et E). Le niveau en ADN viral extracellulaire ne semble en revanche pas affecté ce qui paraît contradictoire par rapport à la diminution observée en ARNpg. Ces résultats préliminaires suggèrent que parmi les 3 facteurs testés, seule la déplétion en NONO pourrait affecter la réplication virale. Cet effet se situe vraisemblablement au niveau la formation de l'ADNccc. Des expériences ultérieures devront être réalisées dans des cellules dHepaRG et PHH pour confirmer ces observations.

Dans l'ensemble, ces analyses préliminaires de l'impact de certaines protéines des Speckles et Paraspeckles sur la réplication d'HBV suggèrent que seulement certaines d'entre elles pourraient moduler le cycle viral : c'est en particulier le cas de SRSF1, composant majeur des Speckles, et de NONO, facteur constitutif des Paraspeckles. Ces deux facteurs pourraient avoir une action provirale puisque leur déplétion diminue la réplication du virus. Ces analyses demandent cependant à être confirmées en particulier dans des modèles de cellules PHH infectées. Quant aux analyses par IF, elles suggèrent qu'au moins une portion de l'HBc nucléaire se trouve à proximité voire colocalise avec les Speckles. Il faut noter que les Speckles et Paraspeckles constituent surtout des sites de stockage de ces protéines qui exercent des fonctions multiples en dehors de ces corps nucléaires. Il est donc possible qu'HBc recrute ces facteurs pour leurs fonctions en dehors de leur lieu de stockage.

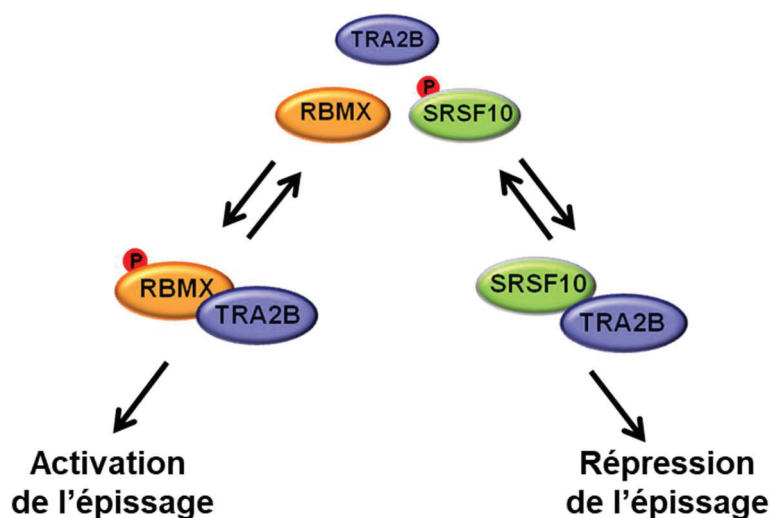


**Figure 37. Effet de l'inhibition de FUS, RBM14 et NONO sur l'établissement et la persistance d'HBV.**

Des cellules dHepaRG ont été transfectées par des siRNA ciblant FUS, RBM14, NONO, ou siRNA contrôle (CTL) puis infectées par HBV à une MOI de 250 vge/cellule. Les cellules ont été récoltées 7 jours après infection. (A) L'efficacité d'extinction de FUS, RBM14 et NONO a été évaluée par Western blot, à J0pi et à J7pi sur les extraits cellulaires totaux. Les paramètres intracellulaires (B et D) ont été quantifiés à J7pi par (RT)-qPCR dans les extraits cellulaires totaux. Les antigènes HBe et HBs (C,E) ont été quantifiés à J7pi par ELISA. (E) Le niveau en virions HBV secrétés a été évalué en quantifiant les ADN HBV par qPCR dans le surnageant. n représente le nombre d'expériences indépendantes réalisées en triplicat.

### II.3. SRSF10 et RBMX/TRA2 $\beta$ exercent des effets opposés sur l'infection par HBV

Deux autres protéines des Paraspeckles, SRSF10 et RBMX (127) ont été identifiées dans le protéome d'HBc. L'analyse de l'interactome d'HBc a permis de mettre en évidence l'importance de ces deux facteurs. SRSF10 est décrite comme une protéine SR navette impliquée principalement dans l'épissage des ARN cellulaires et peut-être dans l'export des ARNm vers le cytoplasme (41,76,81) (cf Introduction I.3.2-3 et I.4.1). Elle possède un rôle fort de répresseur et un rôle mineur d'activateur de l'épissage (80). Elle a été identifiée comme importante pour la régulation de l'épissage des ARN d'HIV-1 *via* son interaction avec TRA2 $\beta$  (259) (cf Introduction I.6.1). De façon intéressante, TRA2 $\beta$  est une protéine relative aux SR identifiée parmi les 11 partenaires d'HBc et qui est aussi parmi les plus fortement enrichies (Figure 29A). Elle est impliquée dans l'épissage des ARN cellulaires et interagit aussi avec RBMX dans le cadre de l'épissage du transcrite du gène SMN (26,94) (cf Introduction I.3.2). Ces trois protéines sont donc associées à HBc, mais semblent aussi interconnectées, possiblement par un jeu de phosphorylation (Figure 38). En effet, les données de la littérature suggèrent que l'interaction entre SRSF10 et TRA2 $\beta$  serait directe et pourrait se faire lorsque le premier est dans un état déphosphorylé (259,477). Au contraire, certaines études suggèrent que l'interaction entre les RBM et TRA2 $\beta$  serait augmentée par la phosphorylation (478).



**Figure 38. Modèle hypothétique d'interaction entre SRSF10, RBMX et TRA2 $\beta$ .**

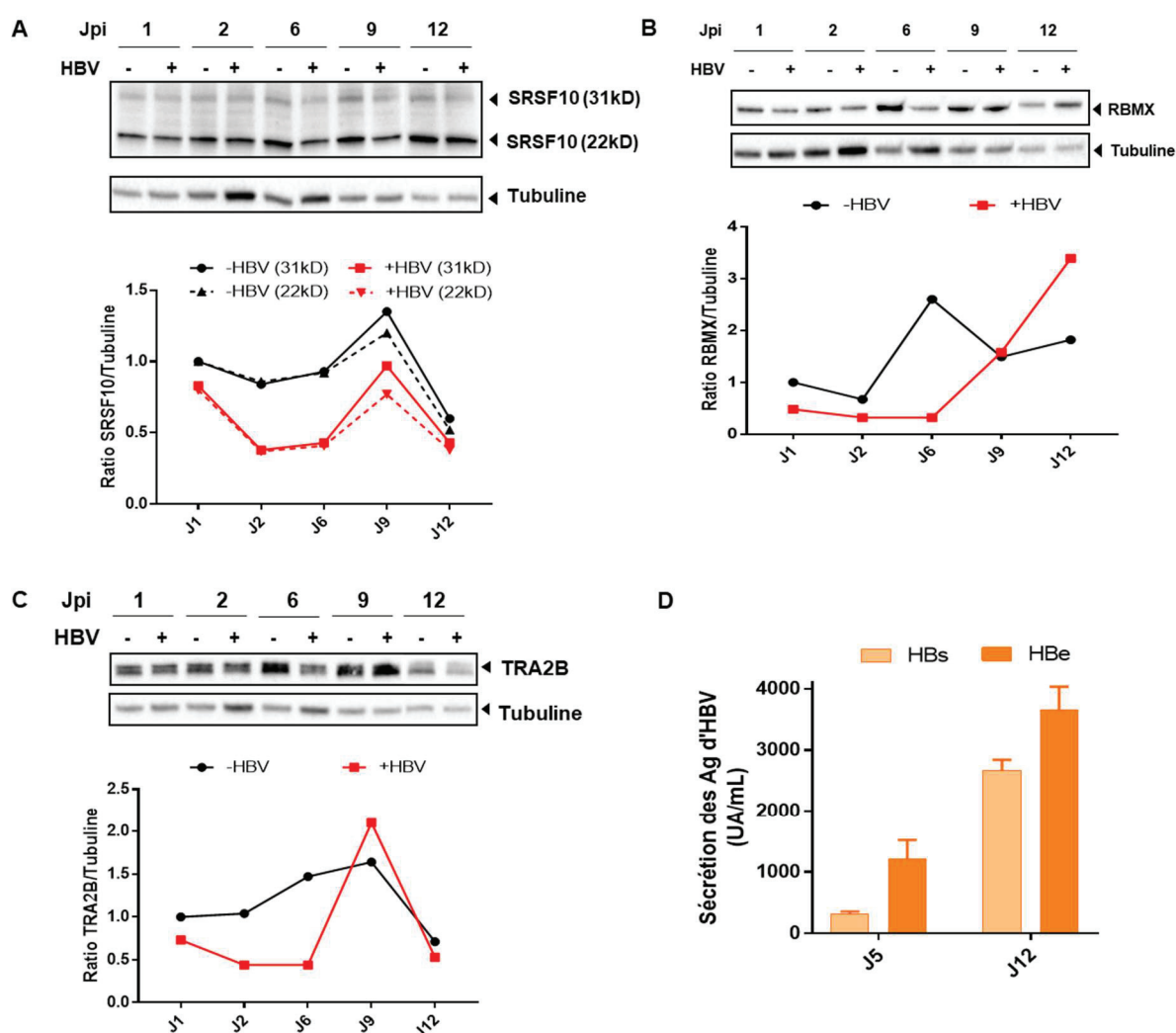
Modulation des interactions entre SRSF10 et TRA2 $\beta$  et entre RBMX et TRA2 $\beta$  en fonction de leur état de phosphorylation et effets connus sur l'épissage des ARN cellulaires et/ou viraux.



### II.3.1. Effet de l'infection par HBV sur l'expression et la localisation de SRSF10, RBMX et TRA2β

Afin de déterminer l'importance de ces trois partenaires d'HBc dans l'infection par HBV, nous avons analysé leur expression et leur localisation dans des PHH au cours de l'infection, grâce à des expériences de Western blot et d'IF.

Des PHH ont été infectés par HBV et récoltés à différents temps après l'infection. L'efficacité d'infection a été contrôlée par quantification des antigènes viraux sécrétés (Figure 39D) et SRSF10, RBMX et TRA2β ont été détectées par Western blot. Le

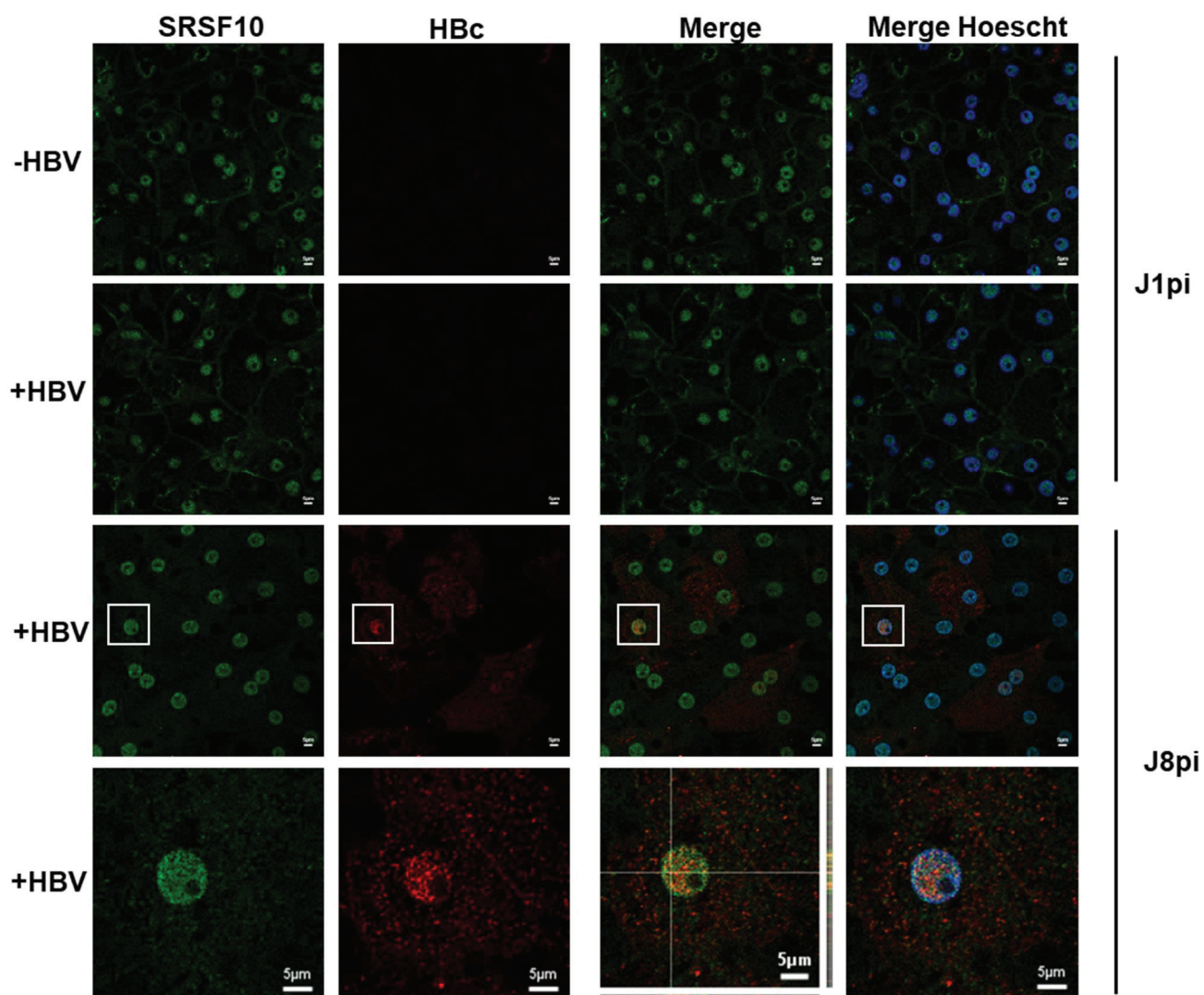


**Figure 39. Expression de SRSF10, RBMX et TRA2β au cours de l'infection par HBV.**

Des PHH ont été infectées ou non par HBV à une MOI de 100 vge/cellule pendant 16h puis récoltées aux temps indiqués après infection. Les extraits protéiques totaux ont été soumis à un Western blot pour détecter SRSF10 (A) RBMX (B) ou TRA2β (C). La détection de la tubuline sert de témoin de charge protéique pour la quantification relative de la protéine d'intérêt au cours du temps. (D) L'efficacité d'infection a été contrôlée par la quantification ELISA des antigènes viraux sécrétés, exprimés en unité arbitraire par mL (UA/mL).

niveau d'expression de chaque protéine a été normalisé par le niveau en tubuline. Dans une première étude cinétique on observe que l'expression des deux isoformes de SRSF10 semble décroître en début d'infection jusqu'à J9pi, puis se normalise par rapport aux cellules non infectées (Figure 39A). La quantification des signaux RBMX suggèrent des variations d'expression de la protéine avec un niveau légèrement inférieur dans les cellules infectées par rapport aux non infectées aux temps précoces, puis une augmentation aux temps plus tardifs (Figure 39B). Quant à TRA2 $\beta$  son expression semble légèrement diminuer par rapport aux cellules non infectées en début d'infection pour ensuite se normaliser à partir du 9<sup>ème</sup> jour d'infection (Figure 39C). Ces résultats préliminaires suggèrent une diminution de l'expression des facteurs SRSF10, RBMX et TRA2 $\beta$ , principalement au début de l'infection. Cependant, des études cinétiques sur d'autres lots de PHH devront être effectuées pour confirmer ces observations. De même des analyses par RT-qPCR permettront de vérifier si ces mêmes variations sont observées au niveau des ARN codant pour ces facteurs.

En parallèle, des analyses ont été aussi effectuées par IF sur des PHH infectées pour suivre l'effet de l'infection sur la localisation de SRSF10 et visualiser une colocalisation éventuelle avec HBc. La difficulté majeure a consisté à identifier un anticorps anti-SRSF10 capable de détecter la protéine par IF. En effet, la plupart des anticorps utilisés pour le Western blot se sont révélés inefficaces en IF. Un marquage visible a été obtenu uniquement avec un anticorps récemment commercialisé par SIGMA (Atlas antibody, HPA053831), spécifiquement pour une détection par IF. Les marquages obtenus dans des PHH contrôle ou infectées par HBV ont révélé un signal majoritairement nucléaire (et exclu des nucléoles) mais également cytoplasmique et, de façon surprenante, membranaire ce qui ne correspond à une localisation connue pour SRSF10 (Figure 40). Les analyses effectuées de J1 à J3 post-infection ne montrent aucune modification du signal SRSF10 dans les cellules infectées. L'expression d'HBc devient visible par IF à partir de J3 (données non montrées) pour culminer à J8 (Figure 40 panneaux inférieurs). Les marquages de SRSF10 et HBc réalisés à ce temps post-infection révèlent une colocalisation importante des signaux HBc et SRSF10 dans le noyau des hépatocytes (Figure 40). Sous réserve d'une vérification ultérieure de la spécificité de cet anticorps (par des analyses en IF dans

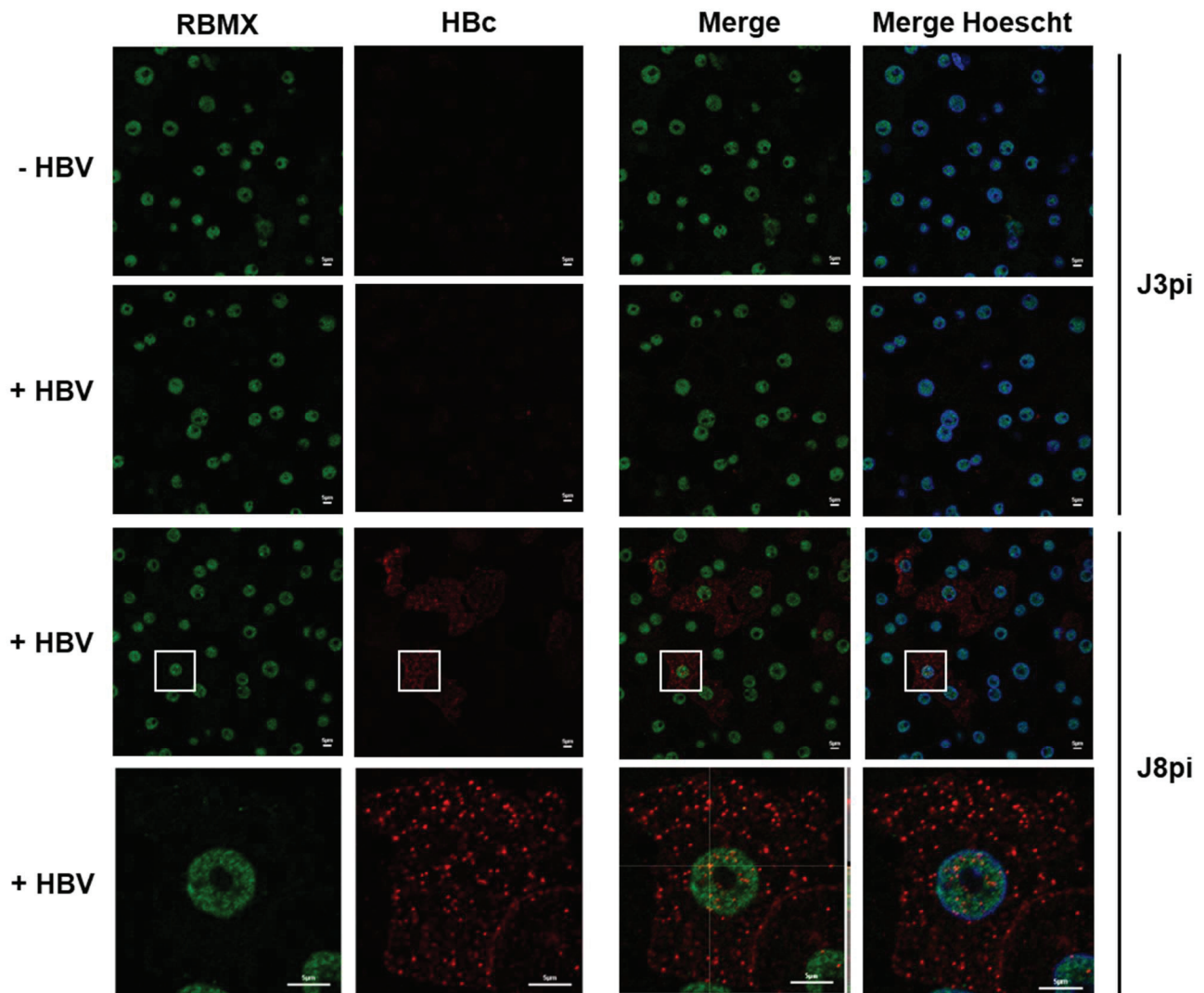


**Figure 40. Localisation de HBc et de SRSF10 durant l'infection par HBV.**

Des PHH infectées à une MOI de 100 vge/cellule ont été analysées par IF aux temps indiqués après infection, en utilisant un anticorps anti-SRSF10 et HBc. Les noyaux ont été colorés au Hoescht et les images acquises au microscope confocal en mode spectral (Zeiss 780).

des cellules traitées par des siRNA SRSF10) ces résultats suggèrent qu'une fraction importante d'HBc colocalise avec SRSF10 dans le noyau des hépatocytes infectés.

La même expérience a été réalisée pour déterminer la localisation de RBMX durant l'infection par HBV (Figure 41). Comme attendu, RBMX présente une localisation nucléaire et est exclu des nucléoles dans les PHH non infectées. L'infection par HBV ne modifie pas de façon visible l'intensité du signal RBMX ni sa



**Figure 41. Localisation de HBc et de RBMX durant l'infection par HBV.**

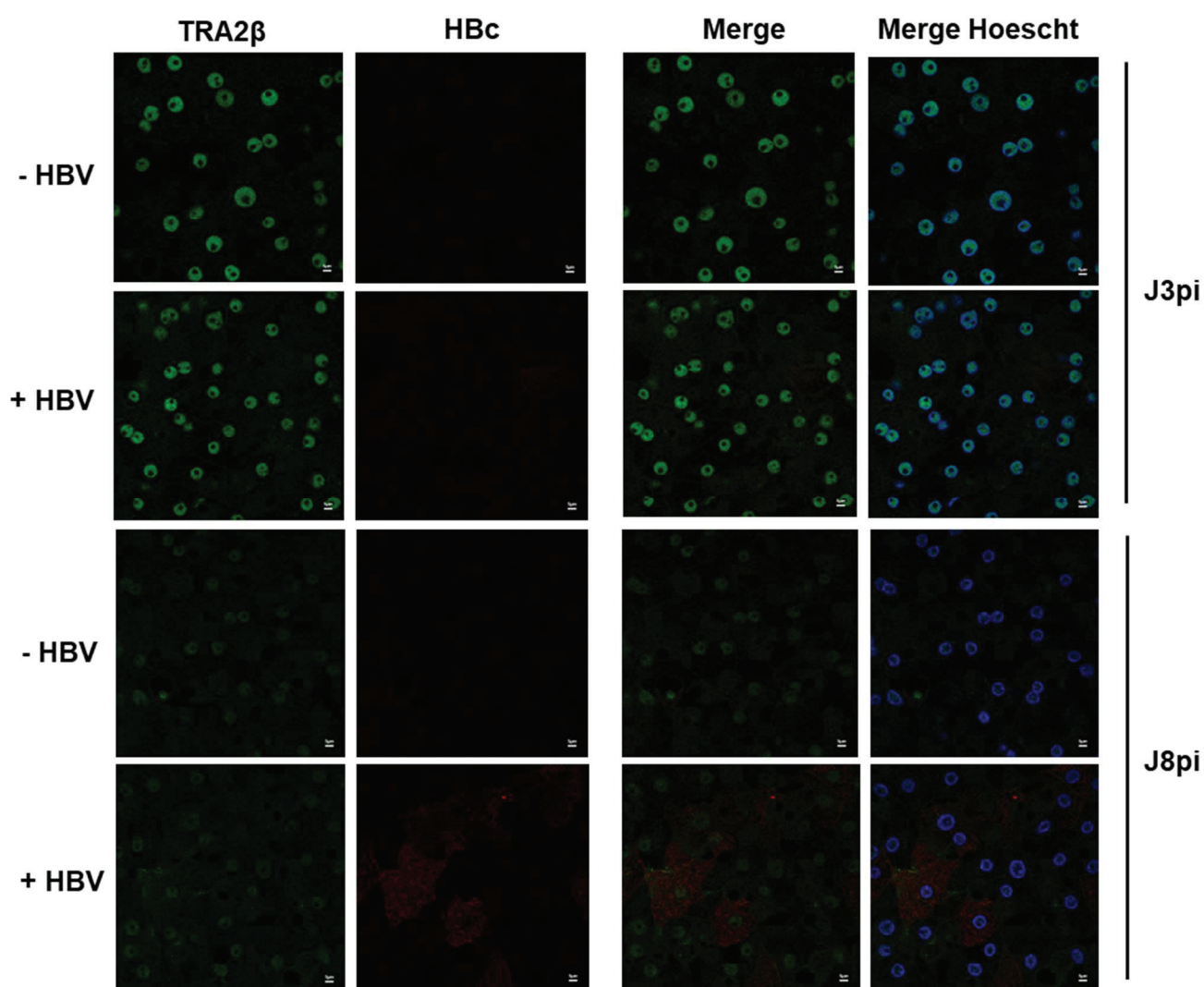
Des PHH infectées à une MOI de 100 vge/cellule ont été analysées par IF aux temps indiqués après infection, en utilisant un anticorps anti-RBMX et HBc. Les noyaux ont été colorés au Hoescht et les images acquises au microscope confocal en mode spectral (Zeiss 780).

localisation intracellulaire. La protéine HBc est détectable à partir de J3pi et son niveau augmente jusqu'à J8. Comme dans le cas des analyses faites sur SRSF10 une partie des signaux HBc colocalisent dans le noyau avec les signaux RBMX suggérant une proximité, au moins partielle, de ces deux protéines dans le noyau des hépatocytes infectés.

Enfin, l'étude de la localisation de TRA2 $\beta$  indique que ce facteur est distribué de façon homogène dans le noyau des hépatocytes, à l'exclusion des nucléoles. A des temps plus tardifs, on observe une diminution nette des signaux TRA2 $\beta$  dans le noyau des hépatocytes infectés ou pas par HBV (Figure 42). De façon étonnante, à ces

temps tardifs, le signal TRA2 $\beta$  a été observé comme étant majoritairement localisé à la surface des cellules, c'est à dire au pôle basolateral (données non montrées). La diminution du signal intranucléaire observée à J8pi rend difficile toute étude de colocalisation avec les signaux HBc.

En conclusion, ces analyses par IF indiquent que l'infection par HBV ne modifie de façon visible pas la distribution intra-nucléaire de SRSF10, RBMX et TRA2B. L'observation d'une colocalisation partielle entre HBc, d'une part, et SRSF10 et RBMX, d'autre part, suggèrent que HBc pourrait interagir avec ces trois facteurs et contribuer à la modification de leurs fonctions pour favoriser l'infection par HBV.



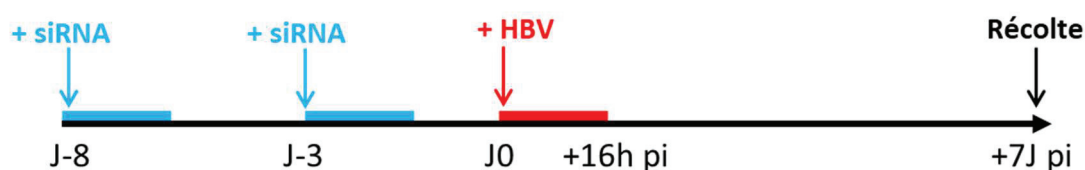
**Figure 42. Localisation de HBc et de TRA2 $\beta$  durant l'infection par HBV.**

Des PHH infectées à une MOI de 100 vge/cellule ont été analysées par IF aux temps indiqués après infection, en utilisant un anticorps anti-TRA2 $\beta$  et HBc. Les noyaux ont été colorés au Hoescht et les images acquises au microscope confocal en mode spectral (Zeiss 780).

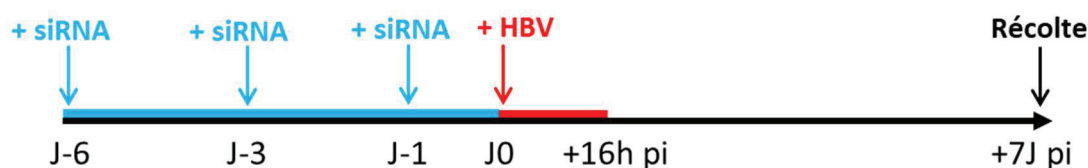
### II.3.2. Rôle de SRSF10, RBMX et TRA2 $\beta$ dans l'infection par HBV

Afin de préciser le rôle de ces trois facteurs dans la réplication d'HBV, chaque protéine a été invalidée individuellement par siRNA dans des cellules dHepaRG et PHH. Dans un premier temps, nous avons analysé l'effet de la déplétion de ces facteurs sur l'établissement et la persistance du virus en réalisant des transfections de siRNA avant l'infection par HBV, comme indiqué dans nos expériences précédentes sur SRSF1 et les facteurs des Paraspeckles (Figure 43A et B). Dans un deuxième temps, la déplétion des protéines cibles a aussi été réalisée après infection par HBV dans les cellules dHepaRG, pour analyser leur effet lorsque l'infection est déjà établie (Figure 43C). Deux composés contrôle ont été inclus dans ces expériences : un inhibiteur d'entrée d'HBV, le peptide PreS1 ajouté aux cellules 24h avant et pendant l'infection et le ténofovir (TDF), un inhibiteur de la réverse transcription, administré 4 jours après l'infection.

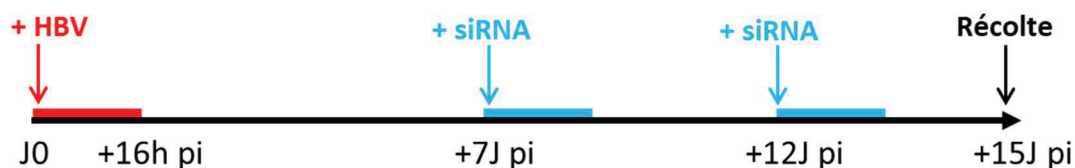
#### A dHepaRG



#### B PHH



#### c dHepaRG

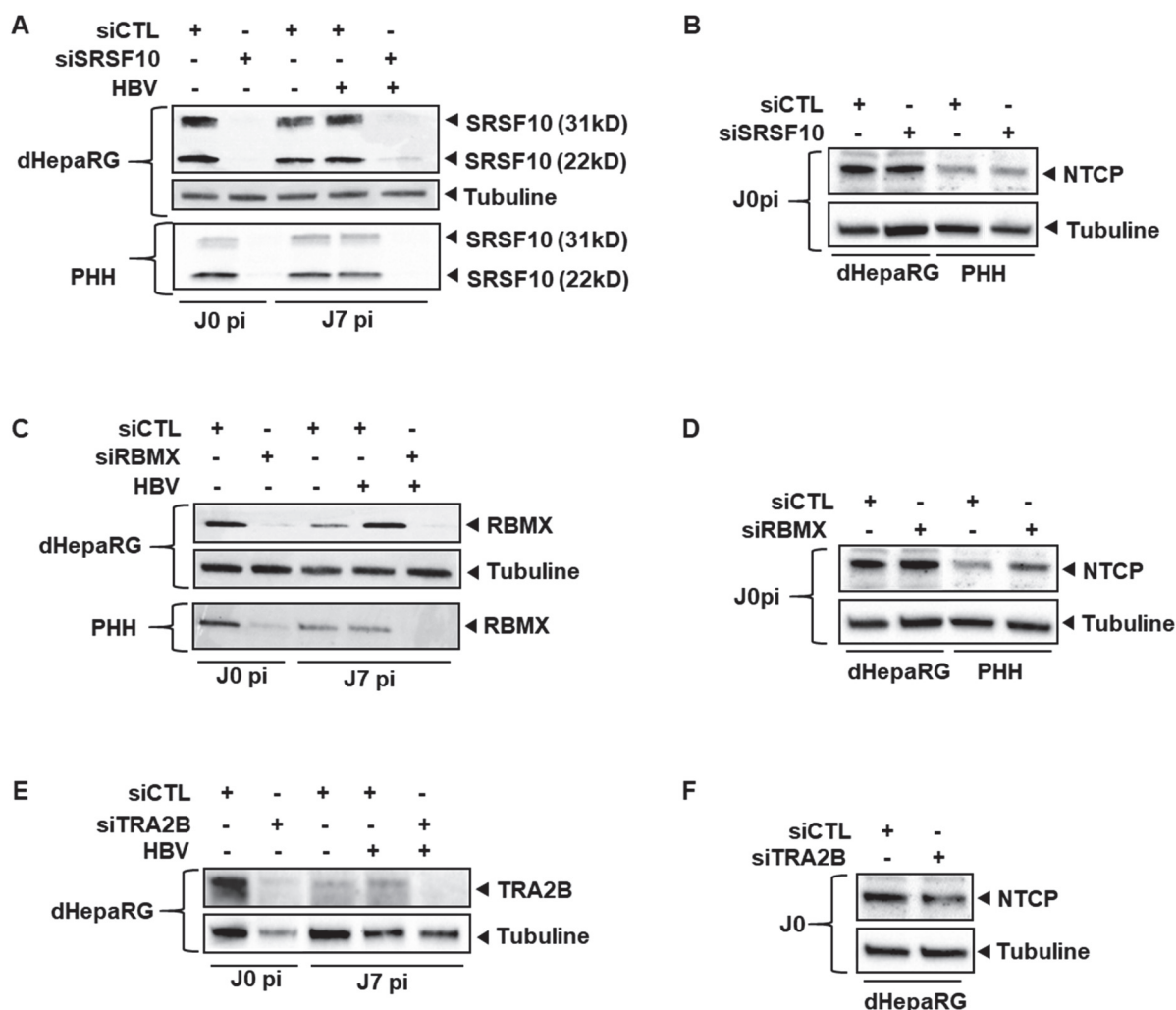


**Figure 43. Protocoles de transfection des siRNA.**

Des cellules dHepaRG ont été infectées par HBV puis transfectées deux fois par des siRNA aux temps indiqués. Les cellules ont été récoltées 15 jours après l'infection.

L'efficacité des siRNA a été contrôlée par Western blot pour chaque protéine d'intérêt. Dans les cellules dHepaRG et PHH transfectées avec les siRNA avant infection par HBV, on observe une extinction efficace de SRSF10 (Figure 44A), RBMX (Figure 44C) et TRA2 $\beta$  (Figure 44E) en comparaison des cellules transfectées avec le siCTL. En parallèle, l'analyse du niveau en récepteur NTCP, réalisée au moment de l'infection (J0), suggère que l'internalisation des particules d'HBV n'est pas affectée par la transfection de chaque siRNA (Figure 44B, D et F).

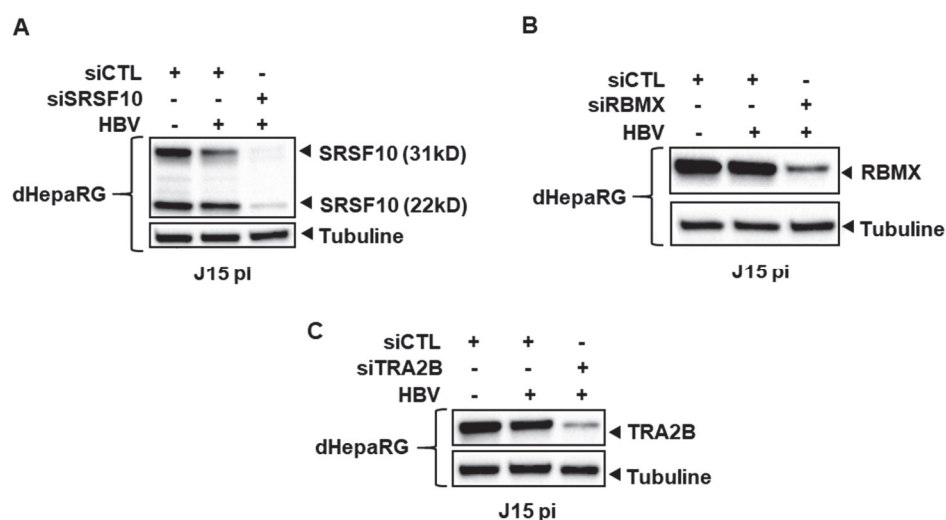
La même analyse réalisée dans les cellules après infection par HBV indique une extinction importante de SRSF10 (Figure 45A) mais légèrement moins efficace pour RBMX et TRA2 $\beta$  (Figure 45B et C). Enfin, pour vérifier l'innocuité des transfusions par



**Figure 44. Effet des siRNA sur l'expression des protéines cibles et du récepteur NTCP, des transfusions réalisées avant l'infection par HBV.**

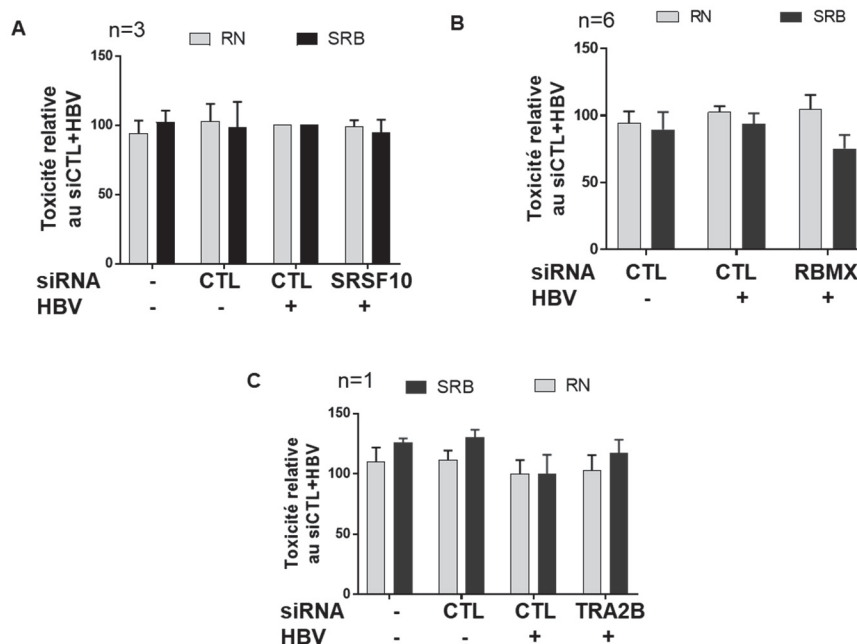
Les cellules dHepaRG ou PHH ont été transfectées par les siRNA SRSF10, RBMX ou TRA2 $\beta$  avant l'infection par HBV. Les extraits protéiques totaux récoltés à J0 ou J7pi ont analysés par Western blot pour détecter SRSF10 (A), RBMX (C) et TRA2 $\beta$  (E). L'expression du récepteur NTCP (B,D,F) a été analysée à J0, dans ces mêmes extraits, grâce à l'anticorps primaire correspondant.

les siRNA et de l'extinction des protéines d'intérêt dans les hépatocytes, nous avons réalisé des tests de viabilité cellulaire (RN) et de densité cellulaire (SRB). Ces tests n'ont pas révélé de toxicité suite à l'invalidation de SRSF10, RBMX et TRA2 $\beta$  (Figure 46A, B et C). Ces résultats indiquent une invalidation efficace des différents facteurs, en l'absence de toxicité. Nous avons pu poursuivre les analyses en nous intéressant à l'effet de ces invalidations sur les paramètres d'HBV.



**Figure 45. Effet des siRNA sur l'expression des protéines cibles lors des transfections réalisées après infection par HBV.**

Les cellules dHepaRG ont été infectées par HBV puis transfectées par les siRNA SRSF10, RBMX et TRA2 $\beta$ . Les extraits protéiques totaux récoltés à J15pi ont été soumis à un Western blot pour détecter SRSF10 (A), RBMX (B) et TRA2 $\beta$  (C) avec l'anticorps primaire correspondant.



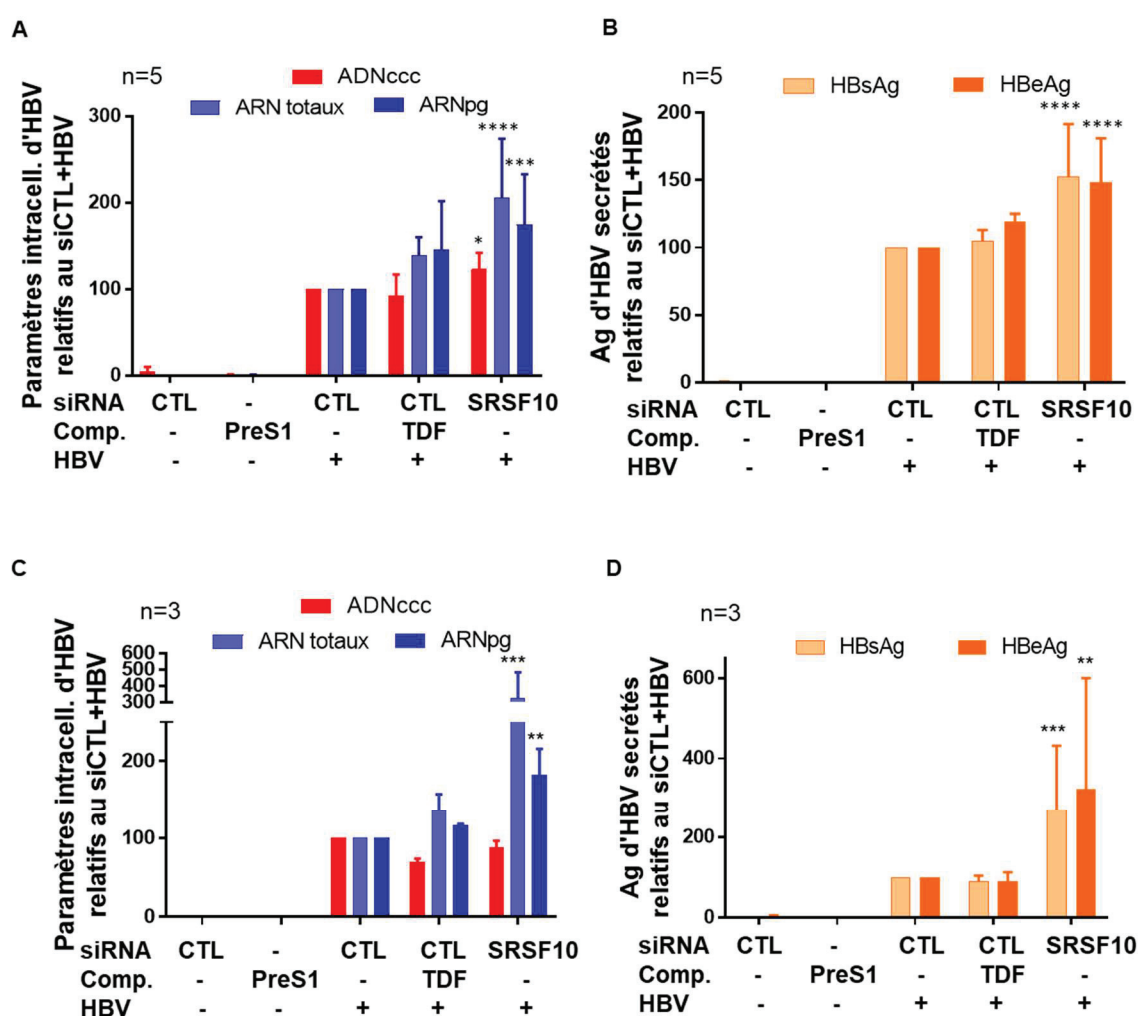
**Figure 46. Analyses de toxicité de la transfection par les siRNA SRSF10, RBMX et TRA2 $\beta$ .**

Les cellules dHepaRG ont été transfectées deux fois par les siRNA SRSF10 (A), RBMX (B) et TRA2 $\beta$  (C). Trois jours après la deuxième transfection des tests de toxicités ont été réalisés au rouge neutre (RN) et à la sulforhodamine B (SRB).



- **SRSF10 et RBMX exercent des effets opposés et agissent à différents niveaux sur le cycle réplcatif d'HBV**

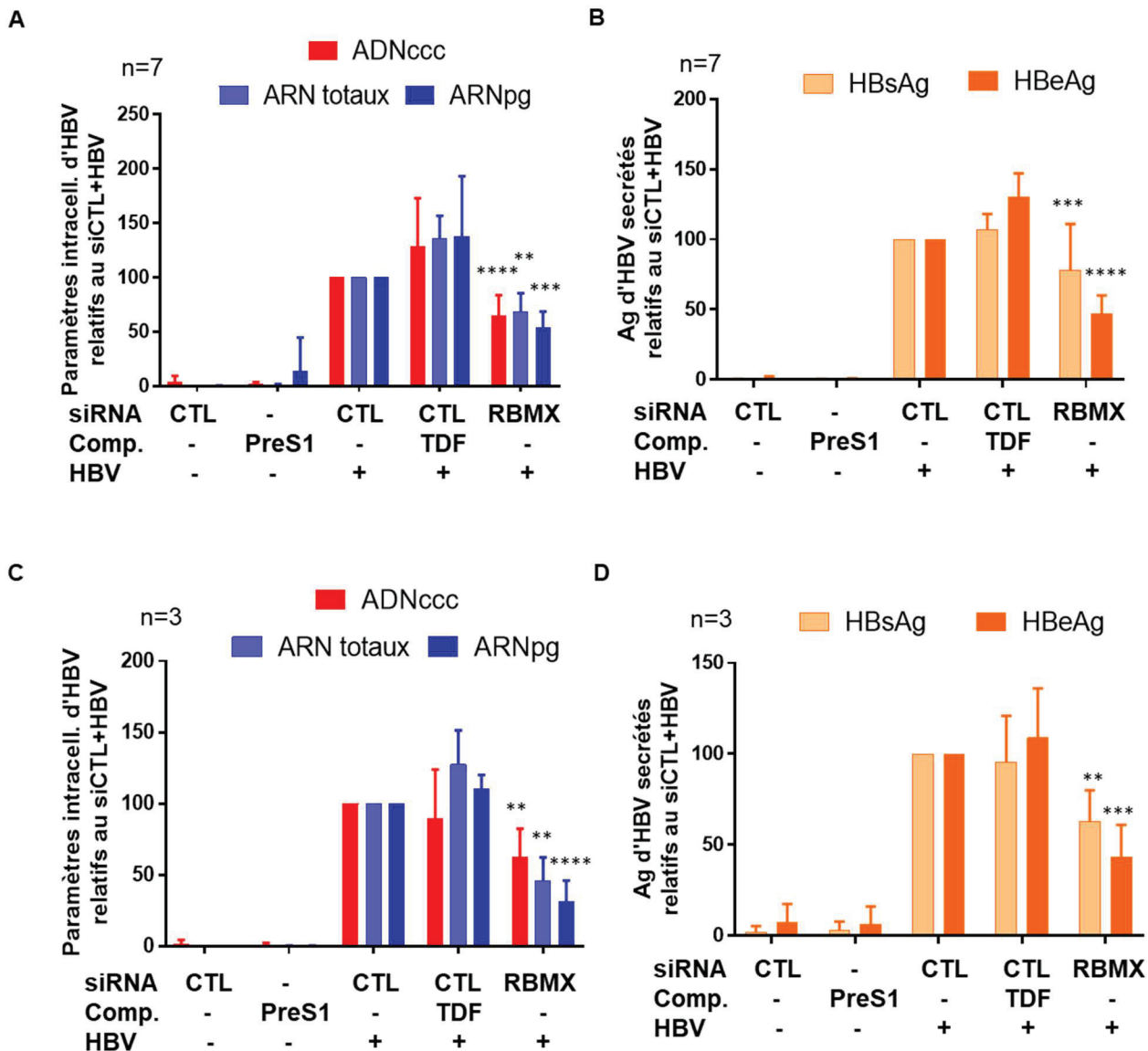
L'analyse des paramètres viraux montre que, dans les cellules dHepaRG, l'absence de SRSF10 au moment de l'infection entraîne une augmentation des ARN totaux d'HBV et de l'ARNpg, ainsi que de la sécrétion des antigènes viraux (Figure 47A et B). Ces effets sont confirmés dans les PHH, où ils sont encore plus marqués (Figure 47C et D). Les niveaux d'ADNccc sont légèrement augmentés dans les cellules dHepaRG lorsque SRSF10 est inhibé, mais ne sont pas affectés dans les PHH. Ces résultats suggèrent que SRSF10 exerce un effet antiviral, en particulier au niveau des ARN d'HBV.



**Figure 47. Effet de l'inactivation de SRSF10 sur l'établissement et la persistance d'HBV.**

Des cellules dHepaRG (A,B) ou PHH (C,D) ont été transfectées par des siRNA ciblant SRSF10 ou des siRNA contrôles (CTL) puis infectées par HBV à une MOI de 250 ou de 100 vge/cellule, respectivement. Des contrôles ont été effectués en traitant les cellules avec le peptide PreS1 24h ou le tenofovir (TDF). Les paramètres intracellulaires d'HBV (A et C) des extraits cellulaires totaux et les niveaux en antigènes HBs et HBe (B et D) sécrétés dans le surnageant ont été quantifiés par (RT)-qPCR et ELISA au moment de la récolte des cellules. n représente le nombre d'expériences indépendantes réalisées en triplicat. L'analyse statistique a été réalisée avec un test de Mann-Whitney avec les significativités suivantes : \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

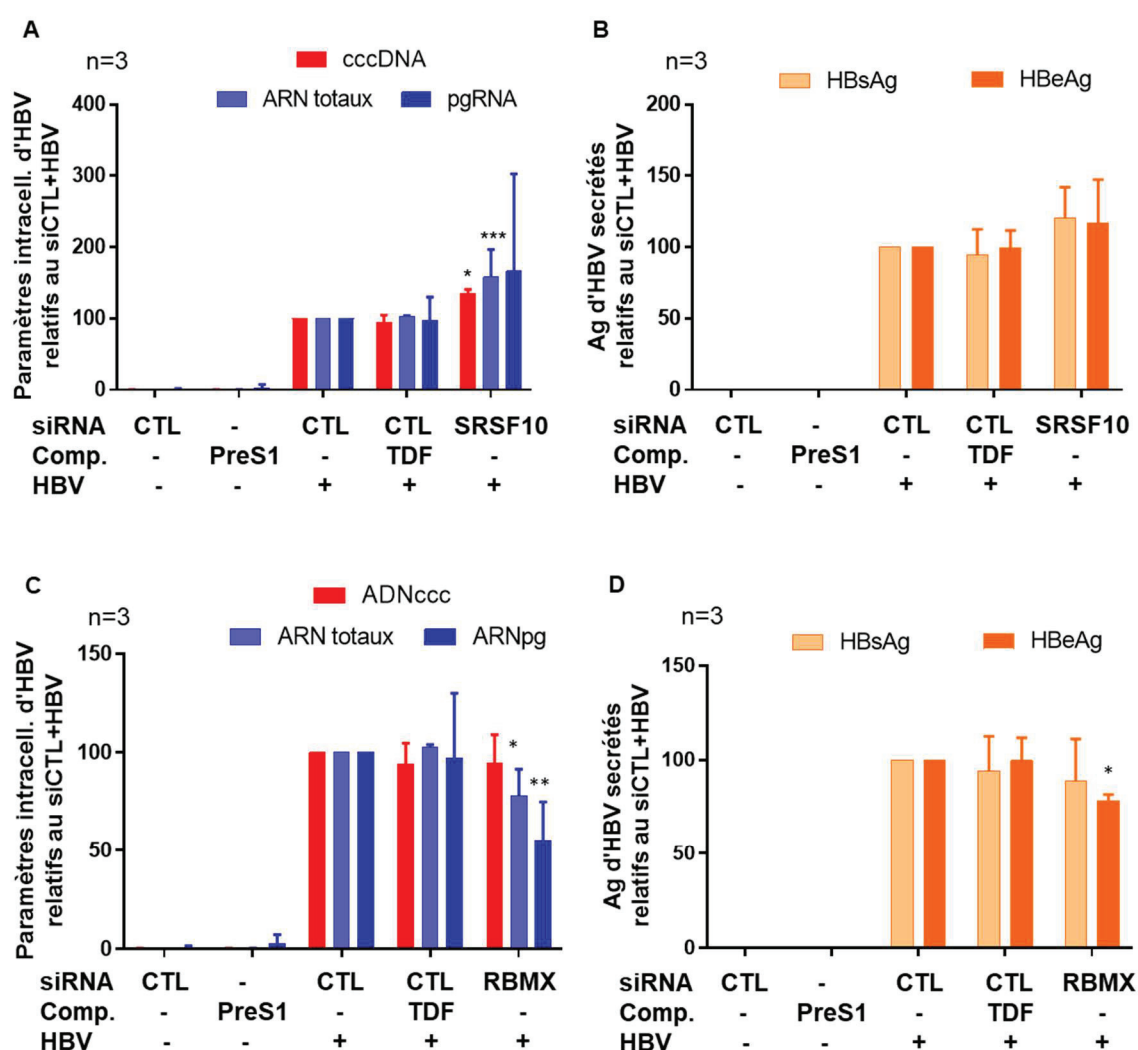
Au contraire, l'absence de RBMX au moment de l'infection entraîne une diminution de tous les paramètres viraux, y compris de l'ADNccc, que ce soit dans les HepaRG ou dans les PHH (Figure 48A-D). La diminution de l'ADNccc suggère que l'effet du siRBMX se situe probablement au niveau de sa formation et explique la chute de tous les autres paramètres viraux (ARN totaux, ARNpg, HBs et HBe) qui dépendent de la quantité d'ADNccc initialement établie dans la cellule. Ces résultats suggèrent que, contrairement à SRSF10, RBMX serait un facteur proviral.



**Figure 48. Effet de l'inactivation de RBMX sur l'établissement et la persistance d'HBV.**

Des cellules dHepaRG (A et B) ou PHH (C et D) ont été transfectées par des siRNA ciblant RBMX ou des siRNA contrôles (CTL) puis infectées par HBV à une MOI de 250 ou de 100 vge/cellule, respectivement. Des contrôles ont été effectués en traitant les cellules avec le peptide PreS1 24h ou le tenofovir (TDF). Les paramètres intracellulaires d'HBV (A et C) des extraits cellulaires totaux et les niveaux en antigènes HBs et HBe (B et D) sécrétés dans le surnageant ont été quantifiés par (RT)-qPCR et ELISA au moment de la récolte des cellules. n représente le nombre d'expériences indépendantes réalisées en triplicat. L'analyse statistique a été réalisée avec un test de Mann-Whitney avec les significativités suivantes : \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

Nous avons ensuite voulu déterminer l'impact de l'inhibition de chaque facteur lorsque l'infection par HBV est déjà établie, grâce aux expériences de transfections de siRNA réalisées après l'infection par HBV. La déplétion de SRSF10 entraîne une augmentation significative des ARN totaux d'HBV, les autres paramètres étant aussi augmentés mais pas de façon significative (Figure 49A et B). De plus comme lors des transfections de siRNA réalisées avant infection, les niveaux d'ADNccc sont légèrement augmentés. Lorsque RBMX qui est inhibée, on observe une diminution



**Figure 49. Effet de l'invalidation de SRSF10 ou RBMX sur la réplication d'HBV.**

Des cellules dHepaRG ont été infectées par HBV à une MOI de 250 vge/cellule puis transfectées par des siRNA ciblant SRSF10 (A,B), RBMX (C,D) ou des siRNA contrôles (CTL). Les paramètres intracellulaires d'HBV (A et C) et des extraits cellulaires totaux et les niveaux en antigènes HBs et HBe (B et D) sécrétés dans le surnageant ont été quantifiés par (RT)-qPCR et ELISA au moment de la récolte des cellules. n représente le nombre d'expériences indépendantes réalisées en triplicat. L'analyse statistique a été réalisée avec un test de Mann-Whitney avec les significativités suivantes : \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

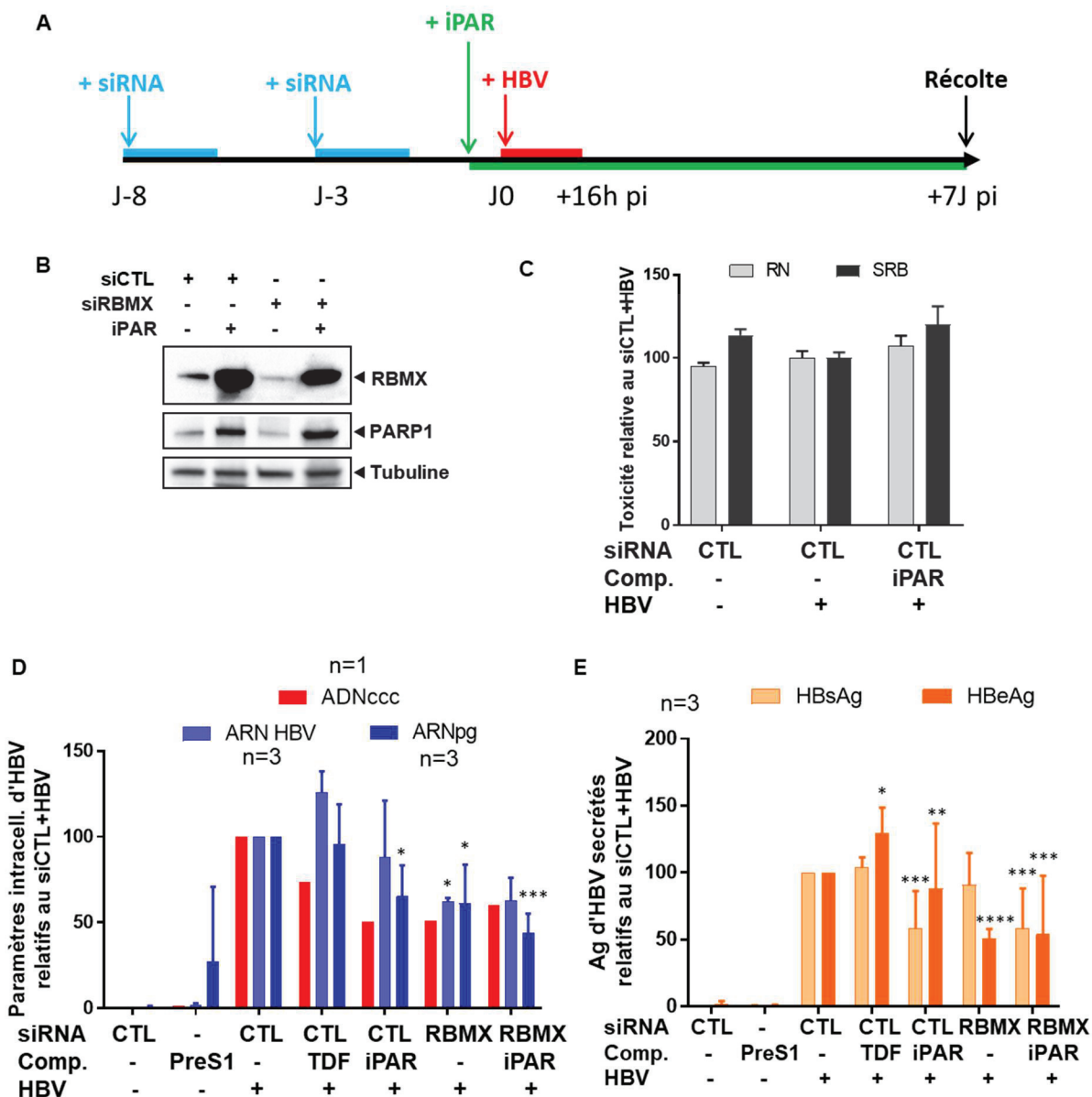
faible mais significative des ARN d'HBV ainsi que de la sécrétion de l'antigène HBe. L'ADNccc et l'antigène HBs ne sont en revanche pas affectés (Figure 49C et D). Bien que la déplétion de RBMX n'ait pas été, dans ces conditions, aussi forte que celle observée lors des transfections avant infection, ces résultats suggèrent que RBMX ne serait pas capable de moduler la quantité en ADNccc une fois l'infection établie. RBMX pourrait donc principalement intervenir en amont de la formation de l'ADNccc.

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent un effet antiviral de SRSF10, qui pourrait intervenir au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel du métabolisme des ARN viraux. Au contraire RBMX semble avoir un rôle proviral sur l'établissement de l'ADNccc et, dans une moindre mesure, dans le métabolisme des ARN viraux.

- **PARylation et rôles de RBMX dans l'infection par HBV**

RBMX est impliqué dans la réponse aux dommages à l'ADN, en se liant au niveau des cassures double brin pour stabiliser et protéger les extrémités endommagées. Ce recrutement a lieu de façon PAR dépendante et permettrait la réparation des lésions. Cependant, la PARylation n'est pas requise pour observer un effet de RBMX sur la réparation (169,209). Puisque RBMX semble impliqué dans l'établissement de l'ADNccc, nous avons voulu tester si l'effet de RBMX sur l'ADNccc était dépendant d'une activité de PARylation. Pour cela, des cellules dHepaRG infectées par HBV, en présence ou pas de siRNA RBMX, ont été traitées par un inhibiteur de l'activité de PARylation de PARP1 (BMN673 ou iPAR) (Figure 50).

Comme dans les expériences précédentes, les cellules dHepaRG ont été transfectées deux fois par les siRNA ciblant RBMX ou les siRNA CTL, puis ont été traitées ou non par l'inhibiteur de l'activité de PARP (iPAR) 24h avant l'infection, pendant l'infection puis tous les 2 jours. Les paramètres viraux ont été quantifiés 7 jours après l'infection (Figure 50A). Comme auparavant, l'inhibition de RBMX a été contrôlée par Western blot (Figure 50B) au moment de l'infection : l'inhibition de RBMX en présence des siRNA RBMX n'est pas totale mais tout de même importante. De façon intéressante, quand la PARylation est inhibée, on observe une surexpression très importante de RBMX, légèrement atténuée par la présence du siRBMX. De plus,



**Figure 50. Effet de l'inactivation de RBMX et/ou de l'activité de PARP1 sur l'établissement de l'infection par HBV.**

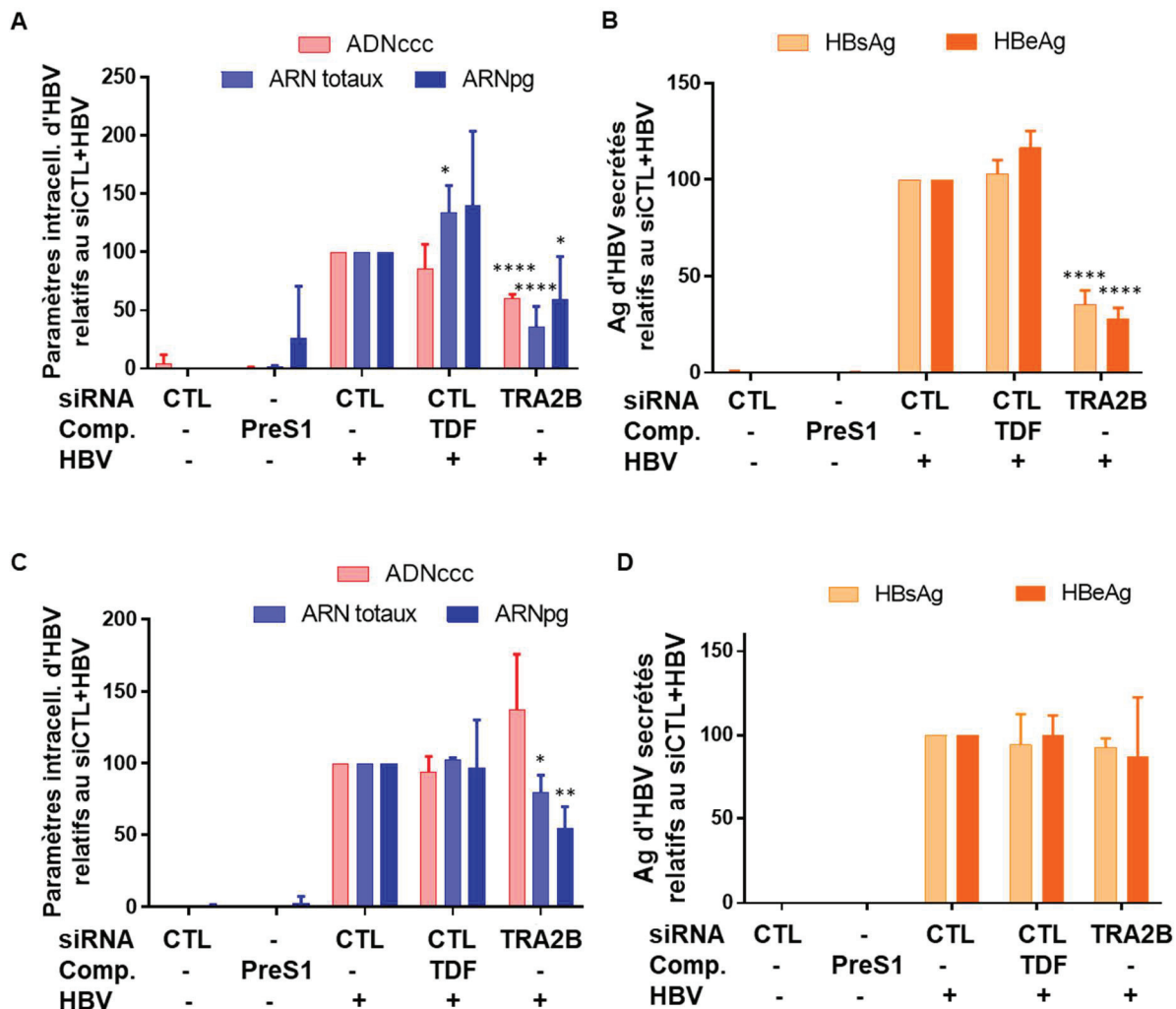
(A) Des cellules dHepaRG ont été transfectées par des siRNA ciblant RBMX ou des siRNA contrôles (CTL) puis infectées par HBV à une MOI de 250 vge/cellule. Un inhibiteur de PARP1 (BMN673 ou iPAR) a été ajouté ou pas aux cellules 24h avant infection puis tous les deux jours. Comme auparavant, des contrôles ont été effectués en traitant les cellules avec le peptide PreS1 24h ou le tenofovir (TDF). (B) Un Western blot a été réalisé sur les extraits protéiques totaux à J0 pour détecter RBMX, PARP1. (C) La toxicité a été évaluée par RB et SRB. Les paramètres intracellulaires d'HBV (D) des extraits cellulaires totaux et les antigènes HBs et HBe (E) sécrétés dans le surnageant ont été quantifiés par (RT)-qPCR et ELISA au moment de la récolte. n représente le nombre d'expériences indépendantes réalisées en triplicat. L'analyse statistique a été réalisée avec un test de Mann-Whitney avec les significativités suivantes : \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

l'expression de PARP1 augmente dans les cellules traitées par l'inhibiteur, en présence ou non des siRNA RBMX. Ces résultats suggèrent donc que l'inhibition de la PARylation induit une accumulation ou une augmentation très importante de l'expression de RBMX et plus modestement de PARP1 (Figure 50B). L'évaluation de la toxicité induite par l'inhibiteur de la PARylation n'indique pas de variation importante de la viabilité ni de la densité cellulaire en comparaison des cellules non traitées (Figure 50C).

L'inhibiteur de PARP seul, comme le siRNA RBMX, entraînent une diminution d'environ 50% des ARN viraux, des antigènes HBs et HBe et de l'ADNccc (Figure 50D et E). La combinaison des deux traitements (iPARP + siRBMX) n'accroît pas de façon significative la réduction de ces paramètres viraux. Ces résultats préliminaires suggèrent que la déplétion en RBMX et sa surexpression en l'absence de PARylation ont un effet similaire sur l'établissement de l'infection par HBV et donc que l'effet de RBMX sur HBV serait PAR-dépendant. Cependant la mesure de l'ADNccc n'ayant été réalisée que sur un lot de dHepaRG, et avec une baisse dans les conditions TDF qui ne devrait pas être observée, il sera important de répéter cette expérience pour confirmer ces résultats.

- **Rôle de TRA2 $\beta$  dans la réplication d'HBV**

Enfin, pour préciser le rôle TRA2 $\beta$ , partenaire commun à SRSF10 et RBMX, dans l'établissement et la réplication d'HBV, nous avons aussi procédé à des invalidations de ce facteur par siRNA, comme dans les expériences précédentes. Dans les cellules dHepaRG, l'absence de TRA2 $\beta$  au moment de l'infection diminue fortement tous les paramètres viraux, y compris de l'ADNccc (Figure 51A et B). Au contraire, la déplétion de TRA2 $\beta$  lorsque l'infection par HBV est établie entraîne une diminution modeste des niveaux d'ARN intracellulaires d'HBV (Figure 51C et D). Ces résultats suggèrent, comme dans le cas de RBMX, un effet proviral de TRA2 $\beta$  au niveau de l'établissement de l'ADNccc et, dans une moindre mesure, au niveau du métabolisme des ARN viraux.



**Figure 51. Effet de l'inactivation de TRA2B sur la réplication d'HBV.**

Des cellules dHepaRG transfectées par des siRNA TRA2β ou des siRNA contrôles (CTL) soit avant l'infection par HBV (A, B) soit après (C,D). HBV a été inoculé à une MOI de 250 vge/cellule. Des contrôles ont été effectués en traitant les cellules avec le peptide PreS1 24h avant et pendant l'infection par HBV ou avec du tenofovir (TDF), 4 jours après l'infection. Les paramètres intracellulaires d'HBV (A, C) des extraits cellulaires totaux et les antigènes HBs et HBe (B,D) ont été quantifiés par (RT)-qPCR et ELISA au moment de la récolte. L'expérience réalisée en triplicat a été répétée avec trois lots indépendants de cellules (n=3). L'analyse statistique a été réalisée avec un test de Mann-Whitney avec les significativités suivantes : \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

## II.4. Effet de SRSF10 et RBMX sur l'épissage des ARN d'HBV

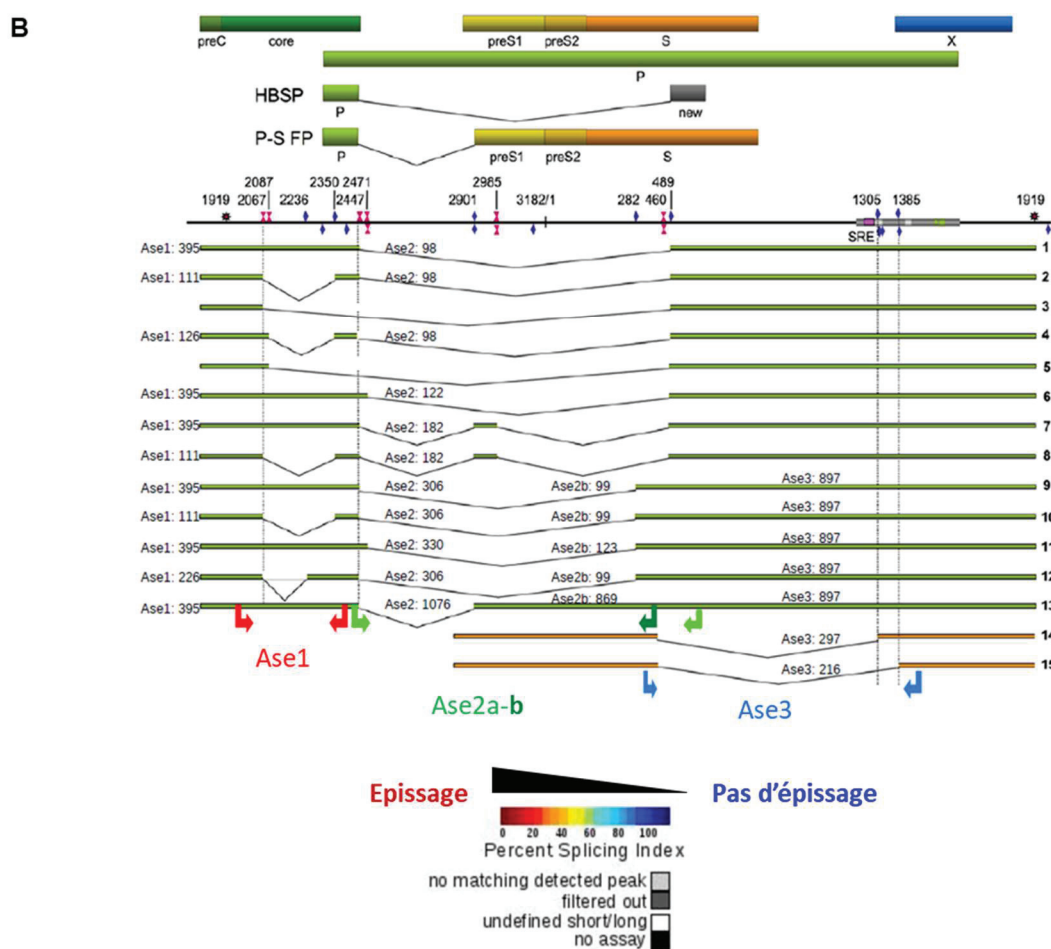
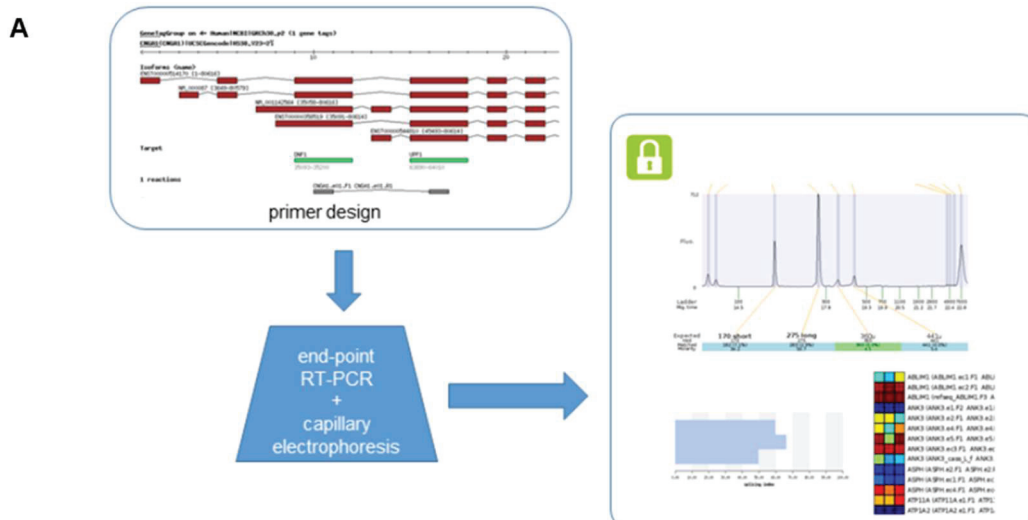
SRSF10 et RBMX sont des RBP principalement impliquées dans le métabolisme des ARN et, en particulier, décrites pour leurs fonctions d'épissage. Or, en plus des ARN non épissés, la réplication d'HBV permet la production de plus de 15 transcrits épissés qui sont associés à la pathogenèse d'HBV (439) (cf Introduction II.4.3). Pour préciser les fonctions de ces facteurs dans l'infection par HBV et déterminer s'ils sont impliqués dans l'épissage viral, nous avons étudié l'effet de leur déplétion sur les ratios des ARN épissés ou non d'HBV.

Le taux d'épissage des transcrits d'HBV a été quantifiés par AS-PCR (pour alternative splicing PCR) (Figure 52A). Cette technique consiste en une analyse semi-quantitative de l'épissage dans une région donnée : les ARN sont rétro-transcrits, puis les trois régions épissées des transcrits d'HBV ont été amplifiées indépendamment, grâce à 4 couple d'amorces spécifiques (Figure 52B : régions Ase1, Ase2a-b et Ase3). Les fragments obtenus sont séparés et quantifiés par électrophorèse capillaire. Le taux d'épissage dans une région donnée est exprimé en PSI (Percent Splicing Index) qui est le ratio de la forme la plus longue (dans le cas d'HBV, la forme non épissée) sur la somme des formes courtes (épissées) et longues (Figure 52B).

En parallèle, une RT-qPCR est réalisée avec différentes paires d'amorces permettant de détecter séparément les ARN non épissés ainsi que 15 formes des ARN épissés (Figure 53). Les résultats de cette RT-qPCR sont exprimés en expression relative au gène de ménage (RE).

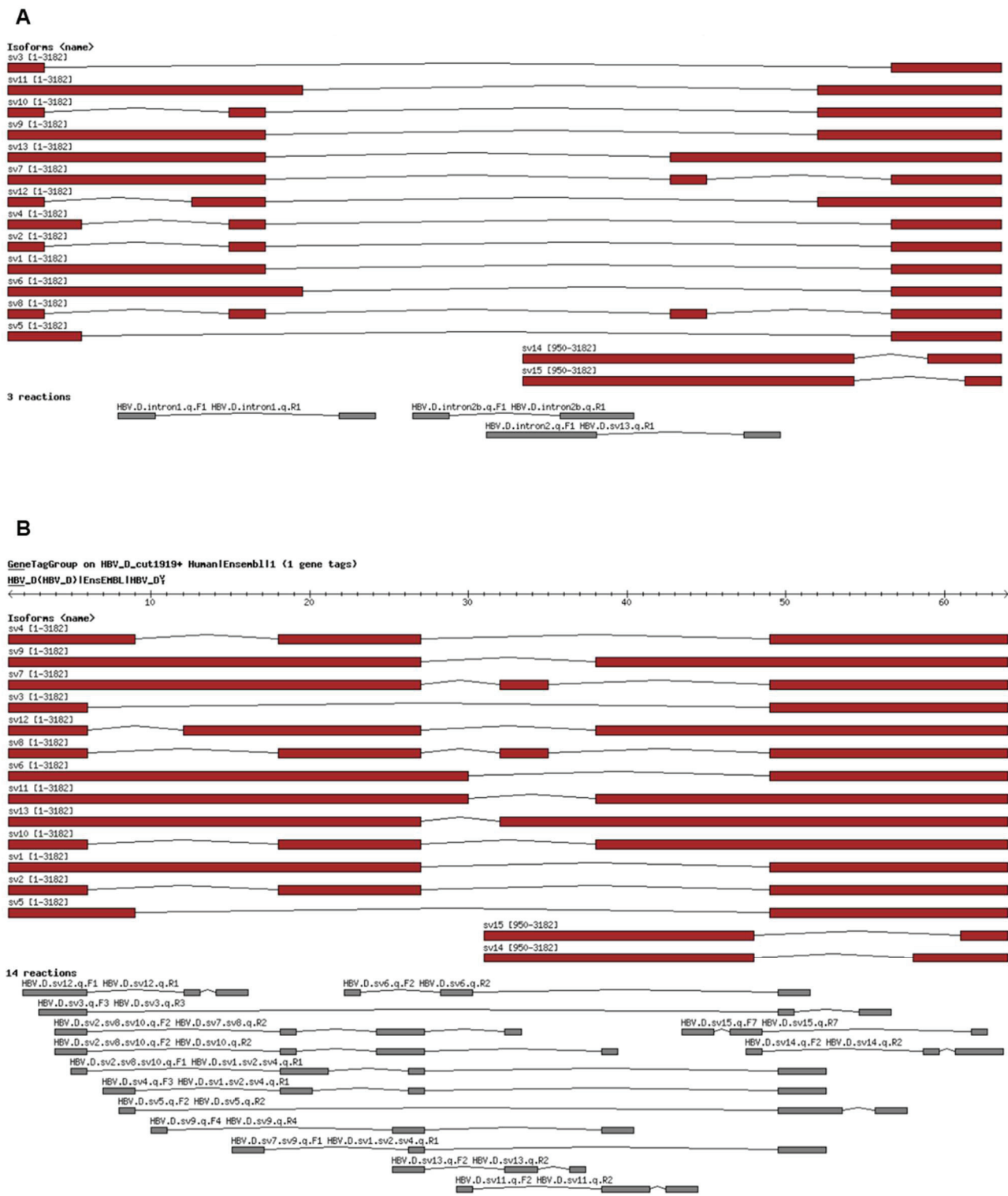
Cette méthode nous a permis, d'une part, de déterminer le taux d'épissage chaque région intronique d'HBV et, d'autre part, de détecter individuellement les transcrits d'HBV dans nos modèles infectieux, en présence ou pas de SRSF10 et RBMX.





**Figure 52. Analyse de l'épissage des transcrits d'HBV par AS-PCR (Alternative splicing analysis by end-point RT-PCR).**

(A) L'AS-PCR consiste en une analyse par RT-PCR des régions épissées des transcrits : les ARN sont reverse transcrits, et les régions d'épissage amplifiées et quantifiées par électrophorèse capillaire. Les évènements d'épissage sont quantifiés et exprimés par le rapport entre la forme la plus longue (non épissée) et la somme des formes courtes (épissées) et longues. Ce ratio est appelé PSI (percent splicing index) (479). (B) Localisation des oligonucléotides utilisés pour amplifier les 4 régions d'épissage d'HBV (Ase1, 2a-b et 3) (adapté de 423).

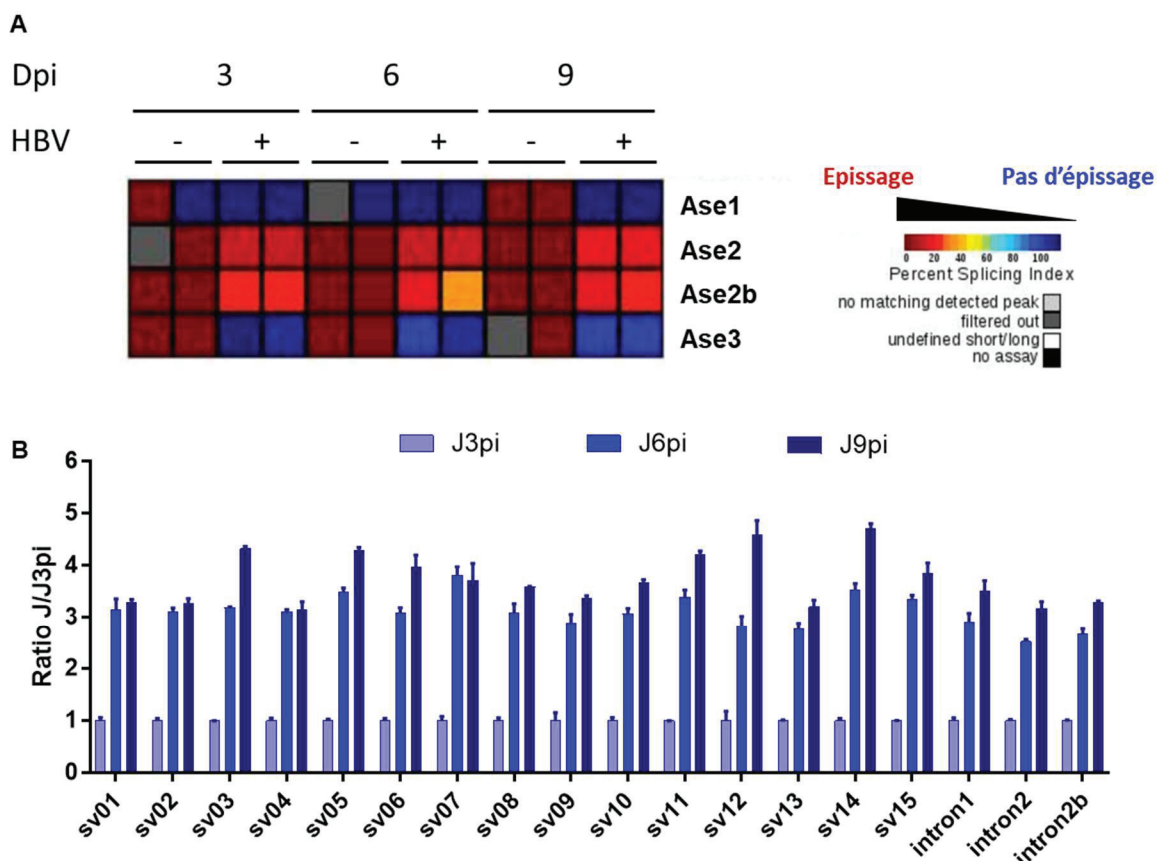


**Figure 53. Amorces permettant la quantification de chaque transcrite d'HBV par RT-qPCR.**  
 (A) Paires d'amorces (en gris) permettant de quantifier les ARN non épissés. (B) Paires d'amorces permettant de quantifier chaque variant individuellement.

### II.4.1. Détection des ARN épissés et non épissés d'HBV dans les cellules dHepaRG

L'épissage d'HBV a été majoritairement décrit *in vivo*, dans des prélèvements de patients (sang ou biopsies hépatiques) et, *in vitro*, dans des modèles basées sur la transfection de génomes HBV dans des cellules hépatiques, le plus souvent des lignées transformées (437,443,480). De ce fait, la première question qui s'est posée était de savoir si cet épissage survenait également dans nos modèles infectieux en culture.

Pour répondre à cette question, des cellules dHepaRG ont été infectées ou non par HBV puis récoltées 3, 6 ou 9 jours après l'infection. L'amplification des régions d'épissage des transcrits HBV indique que la région Ase2a-b est la plus soumise à des évènements d'épissage (PSI faible), la région Ase3 beaucoup moins (PSI élevé) et la région Ase1 de façon indétectable. De plus, l'intensité de l'épissage dans ces régions semble stable au cours de l'infection (Figure 54A). Plus précisément, la quantification



**Figure 54 : Epissage des ARN d'HBV dans les dHepaRG au cours de l'infection.**

Des cellules dHepaRG ont été infectées ou non par HBV pendant 16h à une MOI de 250 vge/cellule, et récoltées au temps indiqués après l'infection. Les ARN extraits des lysats cellulaires totaux ont été soumis à l'analyse par (A) AS-PCR afin de déterminer le PSI pour chaque temps après infection et pour chacune des 4 régions épissées des transcrits d'HBV, et (B) RT-qPCR pour quantifier chaque transcrit d'HBV, épissé ou non, individuellement.

de chaque transcrit au cours de l'infection indique que toutes les formes, épissées ou non, sont détectées dès le 3<sup>ème</sup> jour d'infection et que certaines atteignent leur niveau maximum d'expression à partir du 6<sup>ème</sup> jour alors que d'autres augmentent progressivement jusqu'au 9<sup>ème</sup> jour (Figure 54B). L'efficacité des différents couples d'amorces étant différente, on ne peut cependant comparer les niveaux d'expression de chaque transcrit.

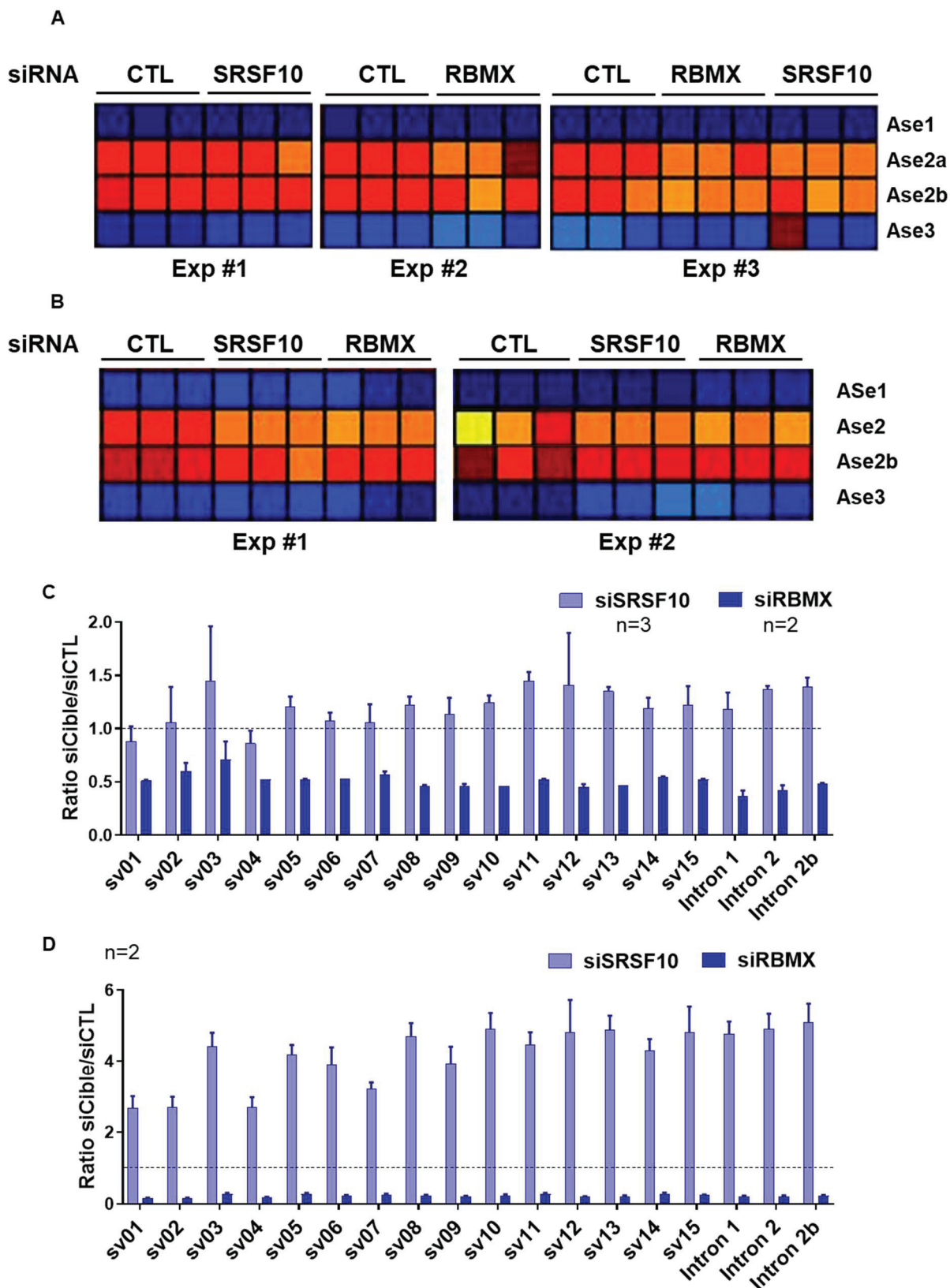
Ces résultats ont permis de valider la présence des différents transcrits d'HBV dans les dHepaRG, et de préciser leur cinétique individuelle d'expression dans ce modèle infectieux.

#### ***II.4.2. Rôle de SRSF10 et RBMX dans l'épissage d'HBV***

Afin de déterminer l'effet de SRSF10 et RBMX sur l'épissage d'HBV, des cellules dHepaRG ou des PHH ont été transfectées avant infection par des siRNA ciblant SRSF10, RBMX ou par un siRNA CTL (Protocole décrit figure 43A et B). Puis sept jours après l'infection, les ARN viraux ont été analysés pour déterminer le niveau d'épissage des régions « Ase » des transcrits viraux et le ratio de chaque transcrit lors de l'inhibition en comparaison au contrôle.

Les résultats obtenus montrent que la déplétion de SRSF10 ou RBMX avant infection ne semble pas moduler le niveau d'épissage global des ARN d'HBV, comme l'indique l'analyse par AS-PCR que ce soit en dHepaRG ou en PHH (Figure 56A et B). La quantification de chaque transcrit indique une augmentation globale de tous les transcrits d'HBV, épissés ou non, en présence des siRNA SRSF10 et, à l'opposé, une diminution globale dans le cas des siRNA RBMX (Figure 56C et D). Ces résultats confirment l'effet opposé de ces deux protéines sur les ARN viraux et révèlent un effet similaire sur tous les transcrits, mais pas au niveau de leur taux d'épissage. Il est probable que TRA2 $\beta$  n'affecte pas non plus l'épissage viral, mais cela devra être confirmé en réalisant ces analyses sur des hépatocytes ou la protéine aura été invalidée.

En conclusion, les facteurs d'épissage SRSF10 et RBMX participent à la réplication d'HBV mais en agissant à des étapes différentes du cycle viral : SRSF10 agirait au niveau des ARN viraux alors que RBMX aurait un effet majeur en amont, au



**Figure 55 : Epissage des ARN d'HBV lors de l'inhibition de SRSF10 et RBMX avant l'infection.** Des cellules dHepaRG ont été transfectées avec des siRNA ciblant SRSF10 ou RBMX (siSRSF10, siRBMX) ou avec un siCTL. Les cellules ont été infectées par HBV pendant 16h à une MOI de 250 vge/cellule pour les dHepaRG et 100 vge/cellules pour les PHH, et récoltées 7 jours après l'infection. Les ARNs extraits des lysats cellulaires totaux ont été soumis à l'analyse AS-PCR dans (A) les dHepaRG (B) les PHH. Chaque transcrite d'HBV épissé ou non a été quantifié par RT-qPCR dans (C) les dHepaRG et (D) les PHH.

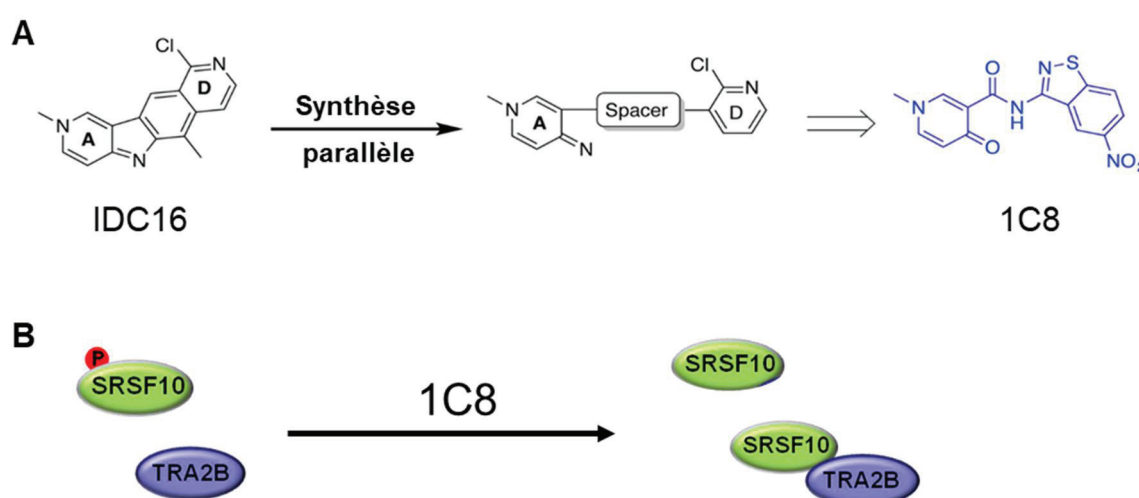
niveau de la synthèse et/ou de l'accumulation de l'ADNccc. De façon intéressante, leur partenaire commun TRA2 $\beta$  semble avoir le même effet que RBMX sur HBV, ce qui suggère que ces deux facteurs pourraient être recrutés ensemble par HBc pour permettre l'établissement de l'infection. Bien sûr, ces trois facteurs pourraient également intervenir pour l'établissement et la réplication de façon indirecte, en modulant le métabolisme des ARNm cellulaires codant pour des facteurs à action pro-ou anti-virale.

L'activité des RBP est régulée par des modifications post-traductionnelles. HBV pourrait donc, par l'intermédiaire d'HBc, interagir avec les RBP en fonction de leurs PTMs et/ou réguler les PTM des RBP pour les détourner à son avantage. En particulier, l'activité des protéines SR est régulée par un jeu de phosphorylation et de déphosphorylation. Ainsi, dans une dernière partie, nous avons étudié en particulier le rôle de la phosphorylation des protéines SR dans l'infection par HBV.

### III- Impact de l'inhibition de la phosphorylation des protéines SR sur la réplication HBV

SRSF10 a été identifié dans notre étude protéomique comme le facteur le plus enrichi parmi ceux interagissant avec HBc. Par la suite, l'inactivation de SRSF10 par siRNA a permis de mettre en évidence un effet anti-viral de cette protéine SR. SRSF10 a été initialement caractérisée pour son rôle répressif de l'épissage des ARN cellulaires. Cette activité a été associée à un état déphosphorylé de cette protéine (75,481) (cf Introduction I.3.2 et I.6.1). L'état de phosphorylation de SRSF10 contrôle aussi son interaction avec d'autres RBP, telles que des hnRNP (K, F et H) ou la protéine relative aux SR TRA2 $\beta$  (189,259). De façon intéressante, lorsqu'elle est phosphorylée, SRSF10 active l'épissage alternatif de certains transcrits cellulaires impliqués dans la réponse au stress, aux dommages à l'ADN, l'apoptose ou la carcinogénèse (82,482) et aussi celui de certains transcrits viraux comme dans le cas d'HIV-1 (259).

Le composé 1C8 a récemment été identifié comme un inhibiteur de la phosphorylation de SRSF10, ayant une forte activité antivirale sur la réplication de HIV-1 (259). 1C8 est un analogue structural d'IDC16, une drogue inhibant l'activité d'épissage de SRSF1 (Figure 56A) (257). Dans cette étude, des analyses moléculaires ont montré que 1C8 n'affecte pas les fonctions d'épissage de SRSF1, mais prévient



**Figure 56. Structure et mode d'action de la molécule 1C8 (JAD01).**

(A) Structure et filiation du composé 1C8 (JAD1). (B) Effet de 1C8 sur la phosphorylation de SRSF10 et son association avec TRA2 $\beta$  (259).

la phosphorylation de SRSF10 (sur la sérine 133) ce qui augmente la formation du complexe SRSF10-TRA2 $\beta$  et module l'épissage des ARN d'HIV-1 (Figure 56B). De plus, l'effet antiviral de 1C8 sur la réplication d'HIV-1 n'avait pas d'impact sur les gènes cellulaires ou la viabilité cellulaire. L'inhibition de la phosphorylation de SRSF10 suite au traitement par 1C8 était corrélée à une baisse de liaison de SRSF10 aux ARNm d'HIV, ainsi qu'à une diminution des niveaux des transcrits viraux épissés (259). Afin de mieux comprendre le rôle de SRSF10 dans notre modèle infectieux, nous avons entrepris de tester l'effet de 1C8 (qui sera par la suite nommé JAD1) sur la réplication d'HBV.

### III.1. Activité antivirale de JAD1 sur la réplication d'HBV

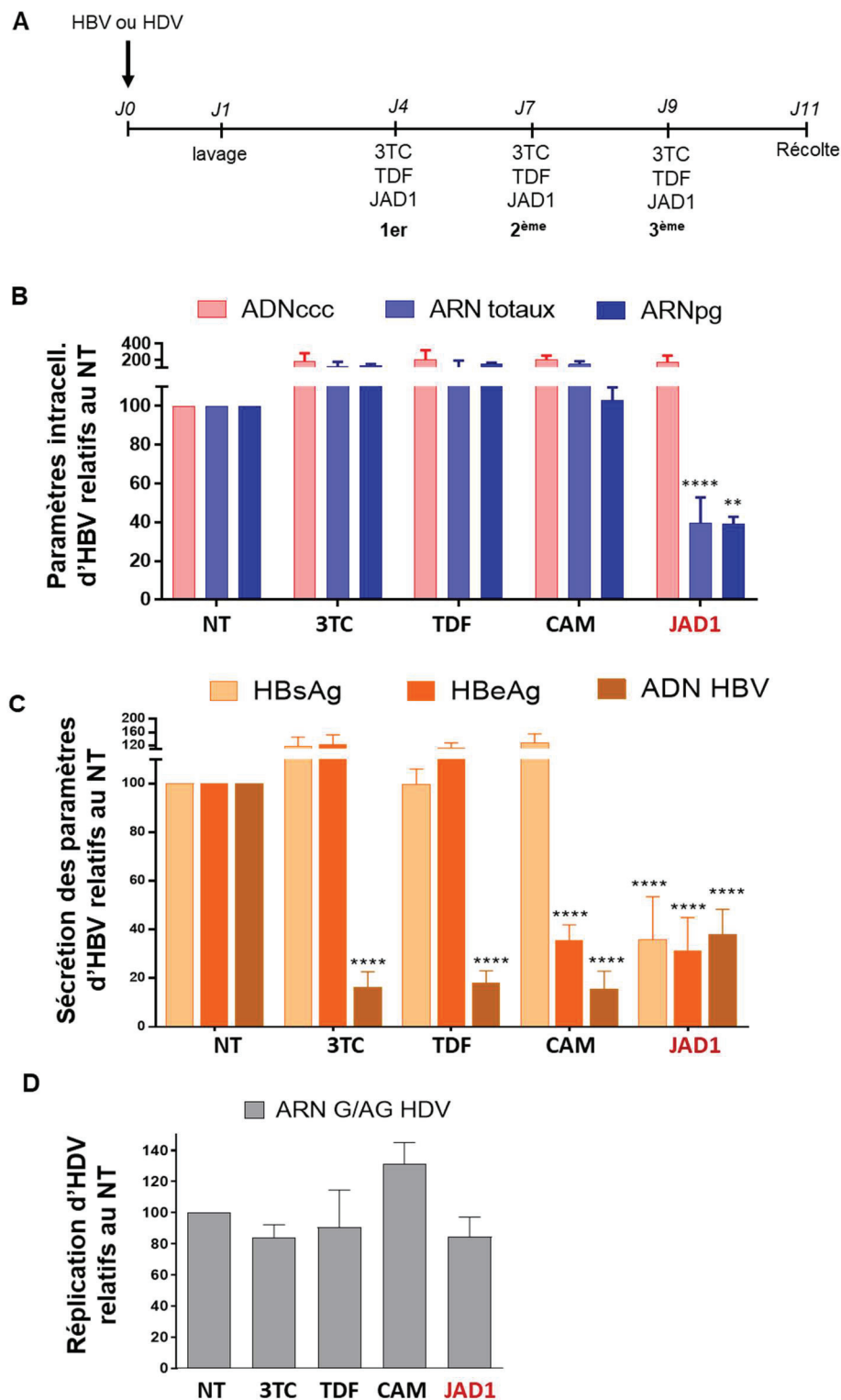
#### *III.1.1. Effet de JAD1 sur la réplication d'HBV*

- **Effet de JAD1 sur la réplication d'HBV dans les cellules dHepaRG**

Dans un premier temps, en nous basant sur l'étude réalisée sur HIV (259), nous avons utilisé une concentration de JAD1 de 10 $\mu$ M pour analyser son effet sur la réplication d'HBV. L'effet du composé JAD1 a été analysé sur des cellules dHepaRG préalablement infectées par HBV et comparé à l'activité de molécules antivirales connues : des analogues de nucléosides (NA : TDF et 3TC ou Lamivudine) qui inhibe la reverse transcription de l'ARNpg en ADNrc et donc la production de particules virales (317) et un modulateur allostérique d'HBc de classe I (CAM) qui accélère la formation de capsides et inhibe la sécrétion d'HBe (322).

Pour cela des cellules dHepaRG ont été infectées par HBV (génotype D) puis, 4 jours après infection, traitées par les différentes molécules (Figure 57A). L'analyse des paramètres viraux, après une semaine de traitement par JAD1 montre une diminution de 60% l'accumulation des ARN intracellulaires d'HBV alors que les NA et la CAM n'affectent pas ces paramètres (Figure 57B). Aucune de ces molécules n'affecte le niveau ADNccc. JAD1 réduit aussi d'environ 60 à 70% la sécrétion des antigènes viraux et des virions d'HBV (mesurés par l'ADN HBV secrété) dans le surnageant de culture. Comme attendu, la sécrétion des virions est aussi fortement affectée par le traitement avec les NUC ou la CAM (diminution d'environ 80%). L'effet de JAD1





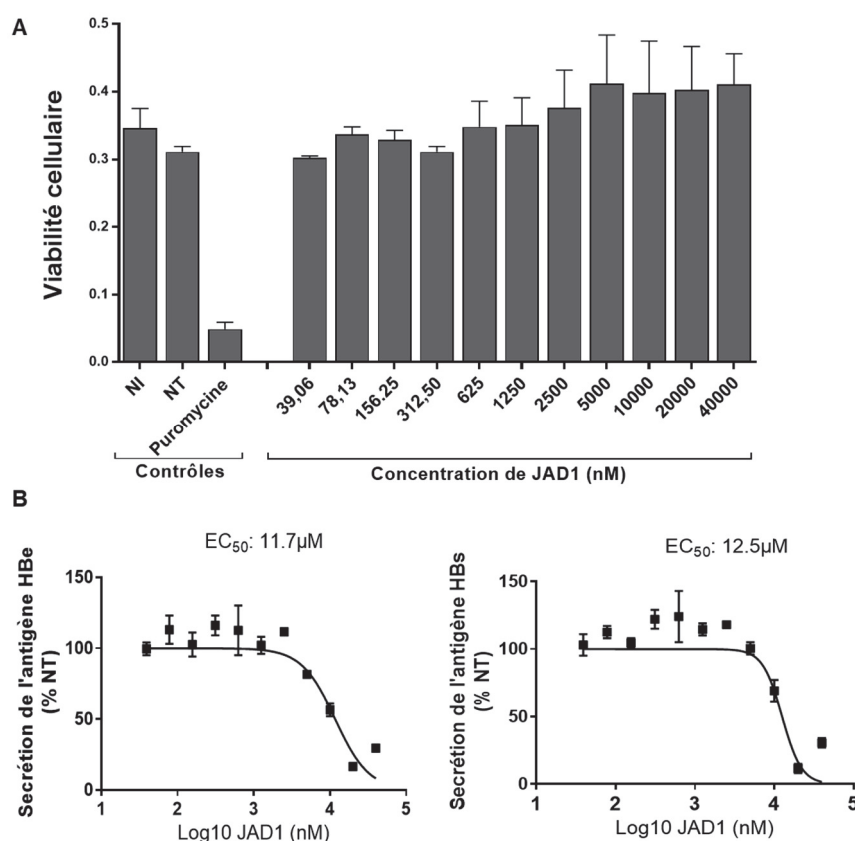
**Figure 57. Effet de JAD1 sur la répllication d'HBV (genotype D) dans des cellules dHepaRG.**

(A) Des cellules dHepaRG ont été infectées par HBV (genotype D) ou par HDV (genotype 1) à une MOI de 250 ou 25 vge/cellule, respectivement. Les molécules indiquées ont été ajoutées au milieu de culture à une concentration de 10µM selon le protocole indiqué. (B) A partir des extraits cellulaires totaux, l'ADNccc, les ARN totaux et l'ARNpg d'HBV ont été quantifiés par (RT)-qPCR 11 jours après infection. (C) Les antigènes HBs et HBe sécrétés dans le surnageant ont été quantifiés par ELISA, et l'ADN HBV contenu dans les virions a été quantifié par qPCR après l'extraction des acides nucléiques du surnageant. (D) Les ARN intracellulaires d'HDV ont été quantifiés par RT-qPCR. 3 d'expériences indépendantes ont été réalisées en quadruplicats. L'analyse statistique a été réalisée avec un test de Mann-Whitney avec les significativités suivantes : \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

diffère de celui des NA et des CAM, en particulier du fait de son effet sur les ARN viraux intracellulaires. De plus, cet effet semble spécifique de la réplication d'HBV puisque JAD1 n'affecte pas la réplication d'HDV (Virus de l'Hépatite D) dans les mêmes conditions (Figure 57D)(483).

### • Toxicité et EC50 de JAD1

Suite à ces premiers résultats, un essai de viabilité, basé sur la quantification d'ATP intracellulaire, a été réalisé pour évaluer la toxicité de JAD1 dans les dHepaRG. Des concentrations de JAD1 allant de 40nM jusqu'à 40  $\mu$ M n'ont pas montré de toxicité significative (Figure 58A) et ont permis de déterminer la concentration efficace médiane (EC50) de JAD1 sur la sécrétion de HBs et HBe : 11,7 $\mu$ M et 12,5 $\mu$ M respectivement (Figure 58B).

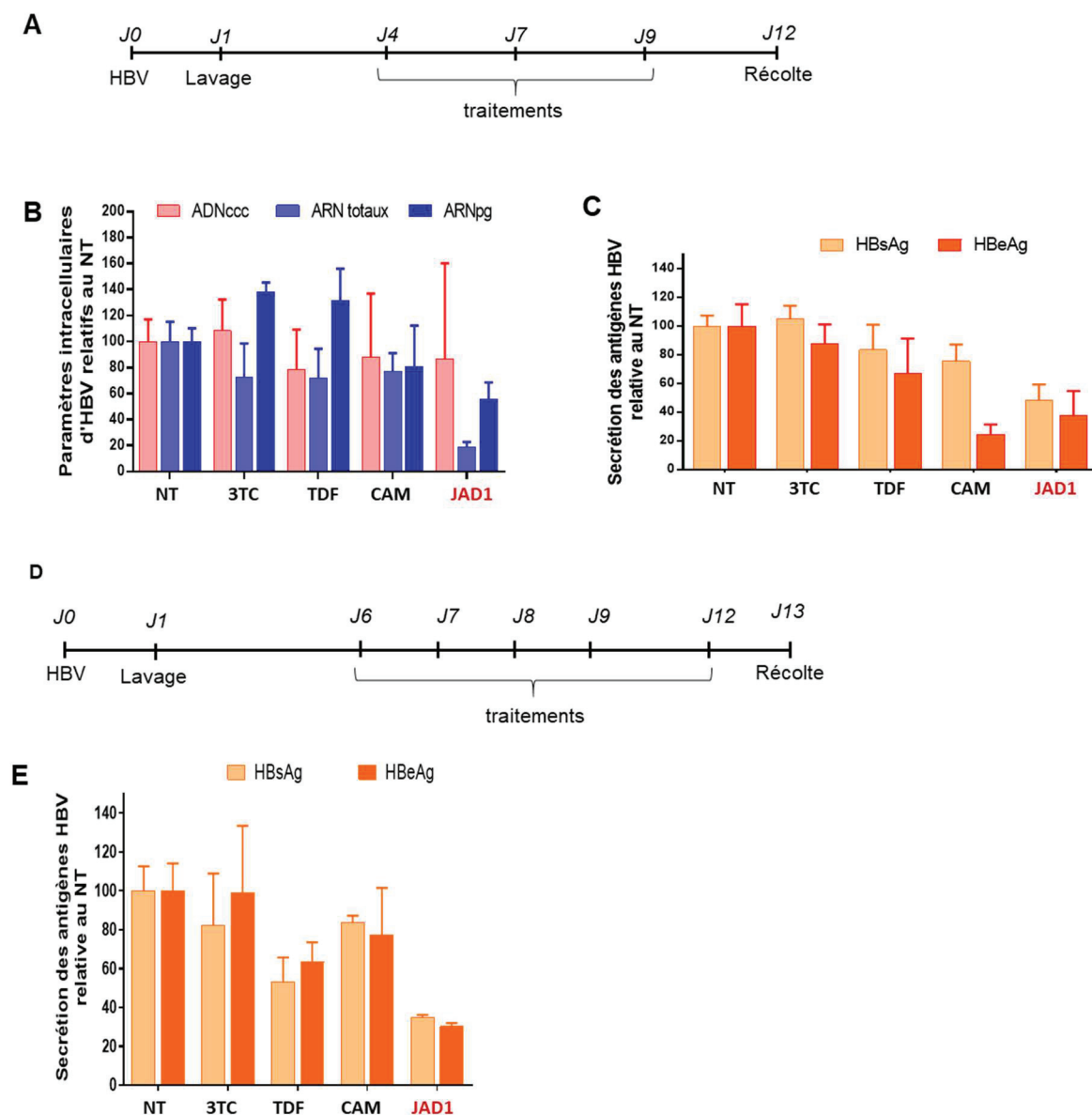


**Figure 58. Toxicité et EC50 de JAD1.**

(A) Des cellules dHepaRG ont été infectées (ou non – NI) par HBV (genotype D) à une de MOI=250vge/mL. 4 jours après l'infection, les cellules ont été traitées par différentes concentrations de JAD1 qui a été renouvelé tous les 2-3 jours. Des cellules non traitées (NT) ou traitées par la puromycine, une molécule toxique, ont servi de contrôle négatif et positif respectivement. La viabilité cellulaire a été évaluée par le test CellTiter-Glo®. (B) Des cellules dHepaRG infectées ont été traitées selon le même protocole par les concentrations indiquées de JAD1, et la concentration efficace médiane a (EC50) été déterminée sur les paramètres sécrétés HBe et HBs.

• **Traitement de JAD1 sur la réplication d'HBV dans les PHH**

L'effet de JAD1 sur la réplication d'HBV a été ensuite confirmé par des analyses en PHH. Puisque les PHH ont une activité de détoxification importante et puisque la demi-vie de JAD1 dans les hépatocytes n'était pas encore connue, nous avons testé deux protocoles de traitements différents : le premier identique à celui utilisé dans les cellules dHepaRG (Figure 59A) et le second avec des traitements plus fréquents



**Figure 59 : Effet de JAD1 sur la réplication d'HBV (genotype D) dans des PHH.**

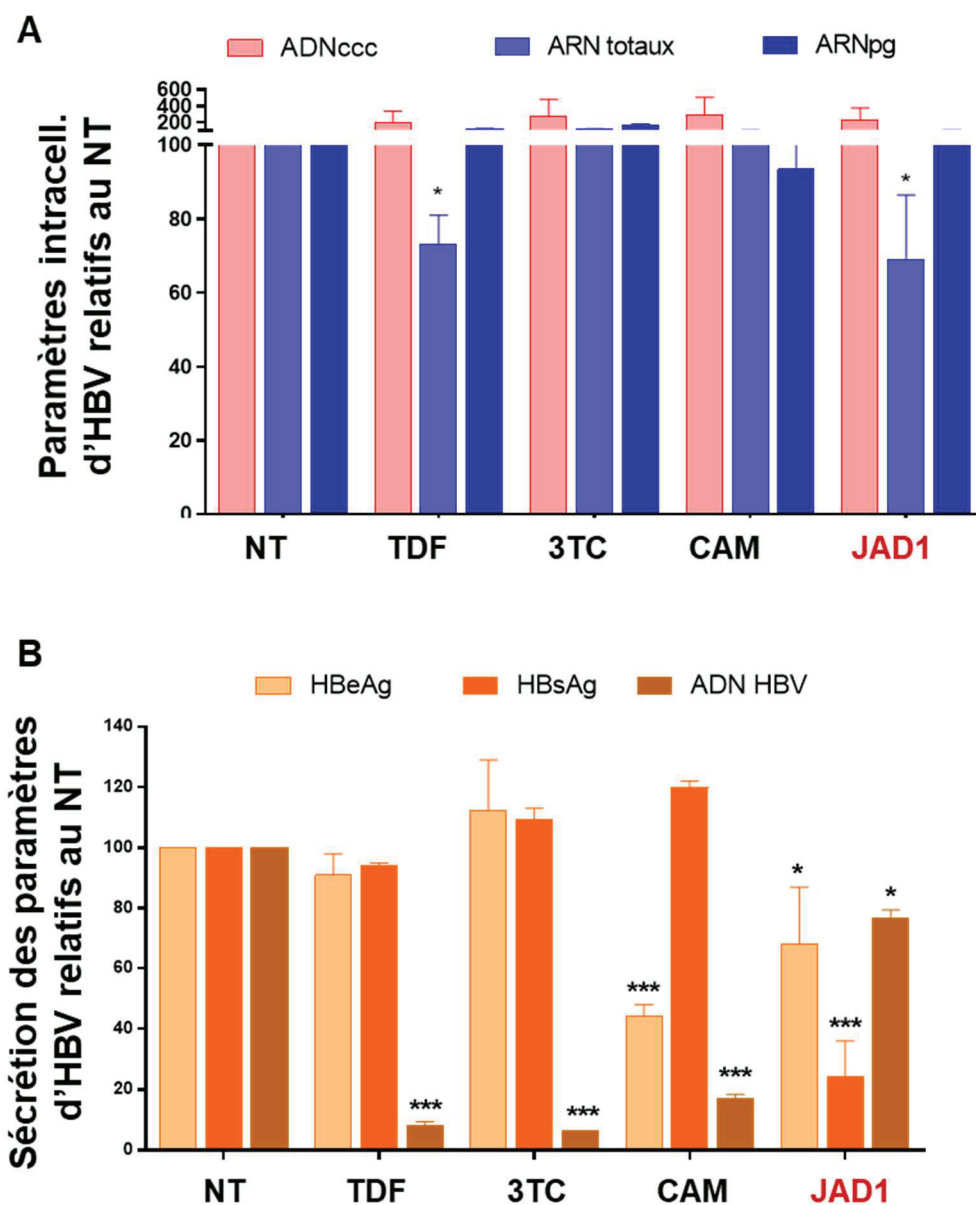
Deux lots de PHH provenant de deux donneurs différents ont été utilisés (lot 1 : A, B et C ; lot 2 : D et E). Les PHH ont été infectés par HBV (genotype D) à une MOI de 100 vge/cellule, puis traitées avec les molécules indiquées à une concentration de 10µM selon les protocoles décrits dans les panneaux (A) et (D). (B) A partir des extraits cellulaires totaux, l'ADNccc, les ARN totaux d'HBV ou l'ARNpg ont été quantifiés par qPCR ou RT-qPCR. (C) et (E) Les antigènes HBs et HBe sécrétés dans le surnageant ont été quantifiés par ELISA. Chaque expérience a été réalisée en quadruplicats biologiques.

(Figure 59D). Le traitement des PHH par JAD1 entraîne une diminution de 80% des ARN totaux intracellulaires d'HBV et, de façon un peu moins marquée, de l'ARNpg (45%) (Figure 59B). La sécrétion d'antigènes chute de 40-50% avec le protocole 1, contre 70% avec une administration de JAD1 plus fréquente (Figure 59C et E). Cette différence pourrait être due à l'utilisation de PHH provenant de donneurs différents. Il sera donc intéressant de répéter ces expériences de comparaison de fréquence d'administration de JAD1 sur des PHH provenant d'un même donneur.

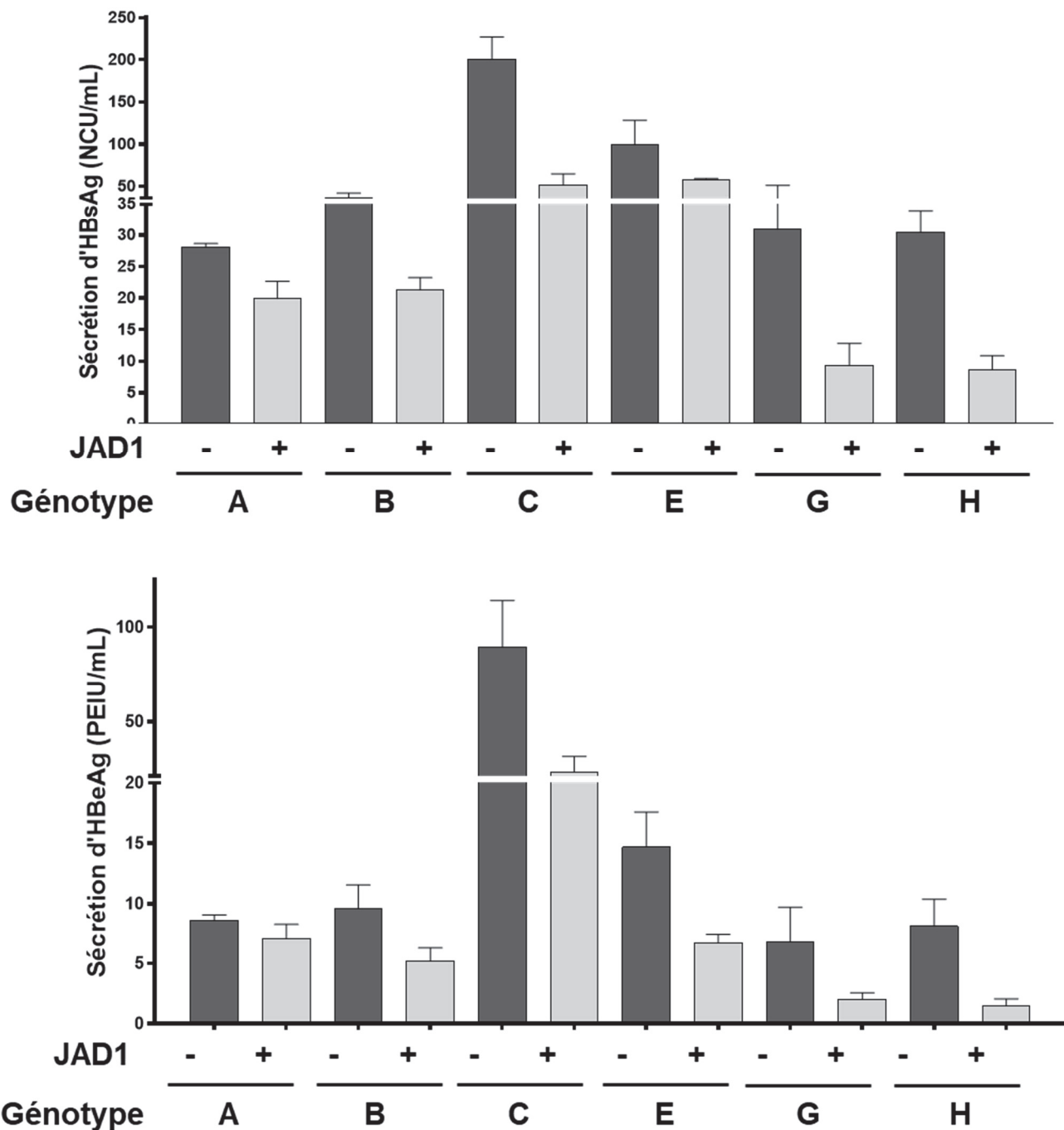
- **Effet de JAD1 sur la réplication d'HBV (Génotypes A, B, C, E, G, H)**

L'ensemble des études décrites ci-dessus a été réalisé avec du virus HBV de génotype D, les autres génotypes (A à H) ayant été peu ou pas développés par les laboratoires de recherche jusqu'à présent. Notre équipe a récemment cloné le génome des 8 génotypes d'HBV et réussi à développer des lignées cellulaires capables de produire des particules infectieuses. Cela nous a permis de tester si l'activité anti-virale de JAD1 était également visible vis-à-vis d'autres génotypes d'HBV. Nous avons d'abord testé l'effet de JAD1 dans des cellules d'HepaRG infectées par le génotype C d'HBV (principalement présent en Asie, voir Introduction II.1.2) selon le protocole décrit dans la Figure 57A. Le traitement des cellules par JAD1 entraîne une diminution d'environ 30% des ARN intracellulaires d'HBV, de la sécrétion de virions et de l'antigène HBe (Figure 60A et B). La sécrétion de l'antigène HBs est, en revanche, plus fortement diminuée (75%) (Figure 60C).

Une étude préliminaire a aussi permis d'étendre cette observation sur un ensemble de six génotypes d'HBV (A, B, C, E, G, H) (Figure 61). Malgré les différences des niveaux de sécrétion basale des antigènes HBs et HBe entre les génotypes, on observe un effet anti-viral important de JAD1 sur les génotypes C, G et H avec une diminution d'environ 70-75%, plus modéré sur les génotypes B et E (45-55% d'inhibition) et moins important sur le génotype A (10-30%) (Figure 61A et B). Bien sûr ce test doit être répété et les autres paramètres viraux mesurés pour préciser l'effet anti-viral de JAD1 sur les différents génotypes d'HBV, mais ces premiers résultats suggèrent que ce composé aurait une activité anti-virale pan-génotypique.



**Figure 60 : Effet de JAD1 sur la réplication d'HBV (genotype C) dans des cellules HepaRG.** Des cellules d'HepaRG ont été infectées par HBV (genotype C) à une MOI de 250 vge/cellules et traitées selon le protocole décrit dans la Figure 56A. (A) A partir des extraits cellulaires totaux, l'ADNccc, les ARN totaux et l'ARNpg d'HBV ont été quantifiés par (RT)-qPCR 11 jours après infection. (B) Les antigènes HBs et HBe sécrétés dans le surnageant ont été quantifiés par ELISA, et l'ADN HBV contenu dans les virions a été quantifié par qPCR après l'extraction des acides nucléiques du surnageant. 2 d'expériences indépendantes ont été réalisées en quadruplicats. L'analyse statistique a été réalisée avec un test de Mann-Whitney avec les significativités suivantes : \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .



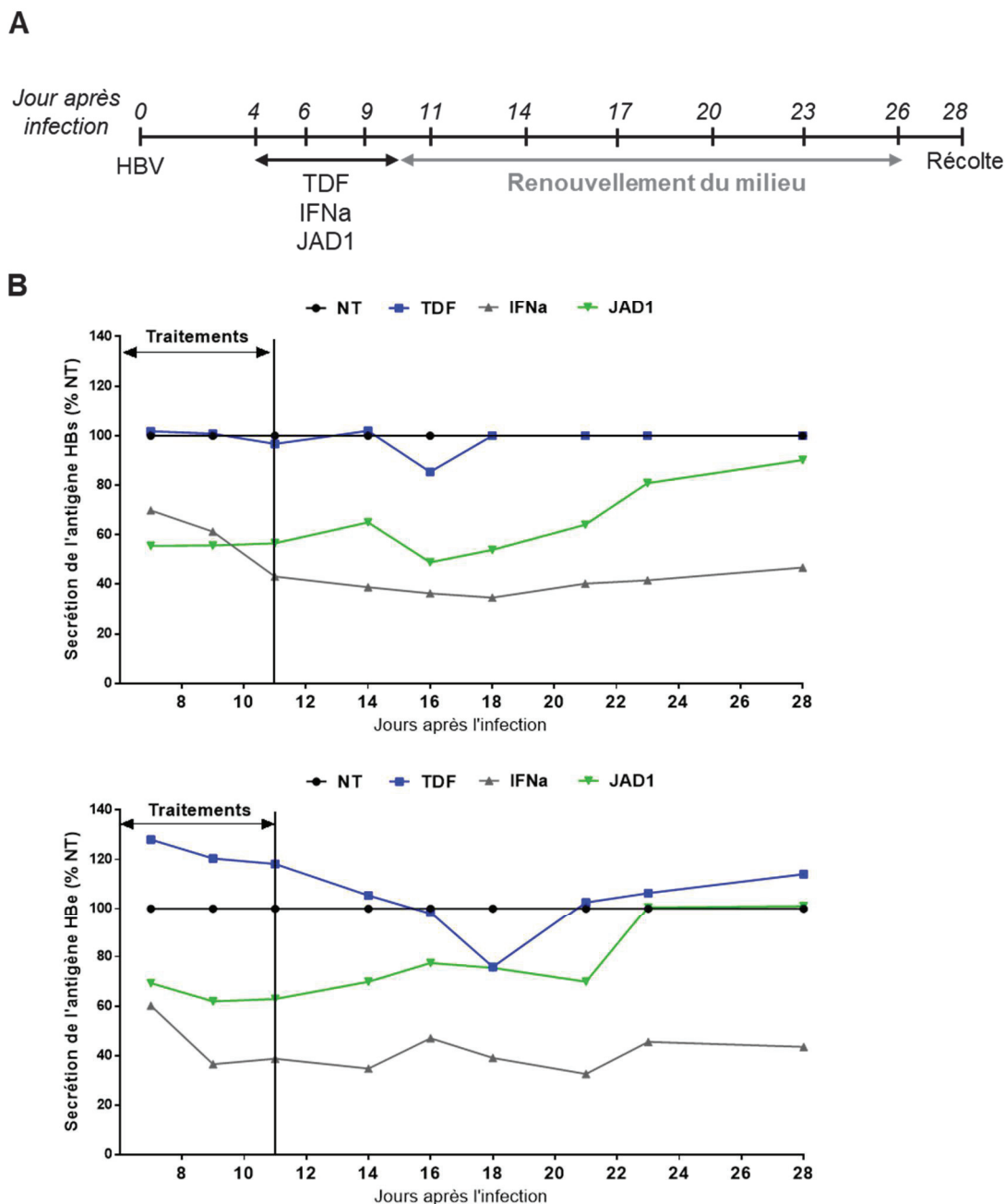
**Figure 61. Effet de JAD1 sur la réplication d'HBV (genotypes A, B, C, E, G, H).**

Des cellules dHepaRG ont été infectées par HBV (avec les génotypes indiqués) à une MOI de 250 vge/cellule. Elles ont été ensuite traitées par JAD1 selon le protocole décrit dans la Figure 56A. Les antigènes HBs et HBe sécrétés dans le surnageant ont été quantifiés par ELISA. L'expérience a été réalisée une fois en quadruplicats biologiques.

### ***III.1.2. Analyse de la réplication d'HBV après l'arrêt du traitement par JAD1 (effet rebond)***

Pour préciser le mode d'action de JAD1, nous avons ensuite évalué l'effet de l'arrêt du traitement sur la réplication d'HBV. En effet, la capacité du virus à « rebondir » après arrêt d'un traitement, quel qu'il soit, constitue un critère important pour la sélection de nouvelles molécules anti-virales qui vont pouvoir se distinguer non seulement par l'amplitude de l'effet inhibiteur, mais aussi par la cinétique avec laquelle s'effectue la reprise de la réplication virale lorsque le traitement est arrêté, l'idéal étant, bien entendu, d'arriver à sélectionner des traitements ou des combinaisons de traitements qui ont un effet à long terme.

Pour cela, des cellules dHepaRG ont été infectées par HBV (génotype D), traitées 3 fois par JAD1, puis les hépatocytes ont été entretenus sans traitement jusqu'à 28 jours après infection (17 jours après arrêt du traitement) (Figure 62A). Le TDF, et l'IFN- $\alpha$  ont été utilisées comme molécules contrôle, le premier permettant d'inhiber la reverse-transcription (317), le second conduisant à une diminution des ARN viraux (312). Comme attendu, les antigènes HBs et HBe sont peu affectés par la présence ou l'absence de TDF. En revanche, le traitement par l'IFN- $\alpha$  entraîne une diminution importante des niveaux en HBe et HBs et cet effet anti-viral est stable jusqu'à la fin de l'expérience. L'activité antivirale de JAD1 est visible dès le premier traitement, avec une inhibition d'environ 30 à 45% de la sécrétion d'HBs et HBe et s'atténue progressivement après l'arrêt des traitements, pour revenir à une sécrétion identique à celle observée en l'absence de traitement, 12 et 17 jours après l'arrêt pour HBe et HBs respectivement (Figure 62B et C). Ces résultats suggèrent que l'effet de JAD1 serait moins stable dans le temps que celui de l'IFN- $\alpha$ . Il faut cependant remarquer que dans cet essai, l'effet de JAD1 était moins important que celui observé dans les expériences précédentes, probablement à cause d'un problème de stabilité de la molécule. D'autres expériences actuellement en cours, incluant non seulement des traitements individuels mais également des combinaisons, nous permettront de mieux préciser ces résultats.



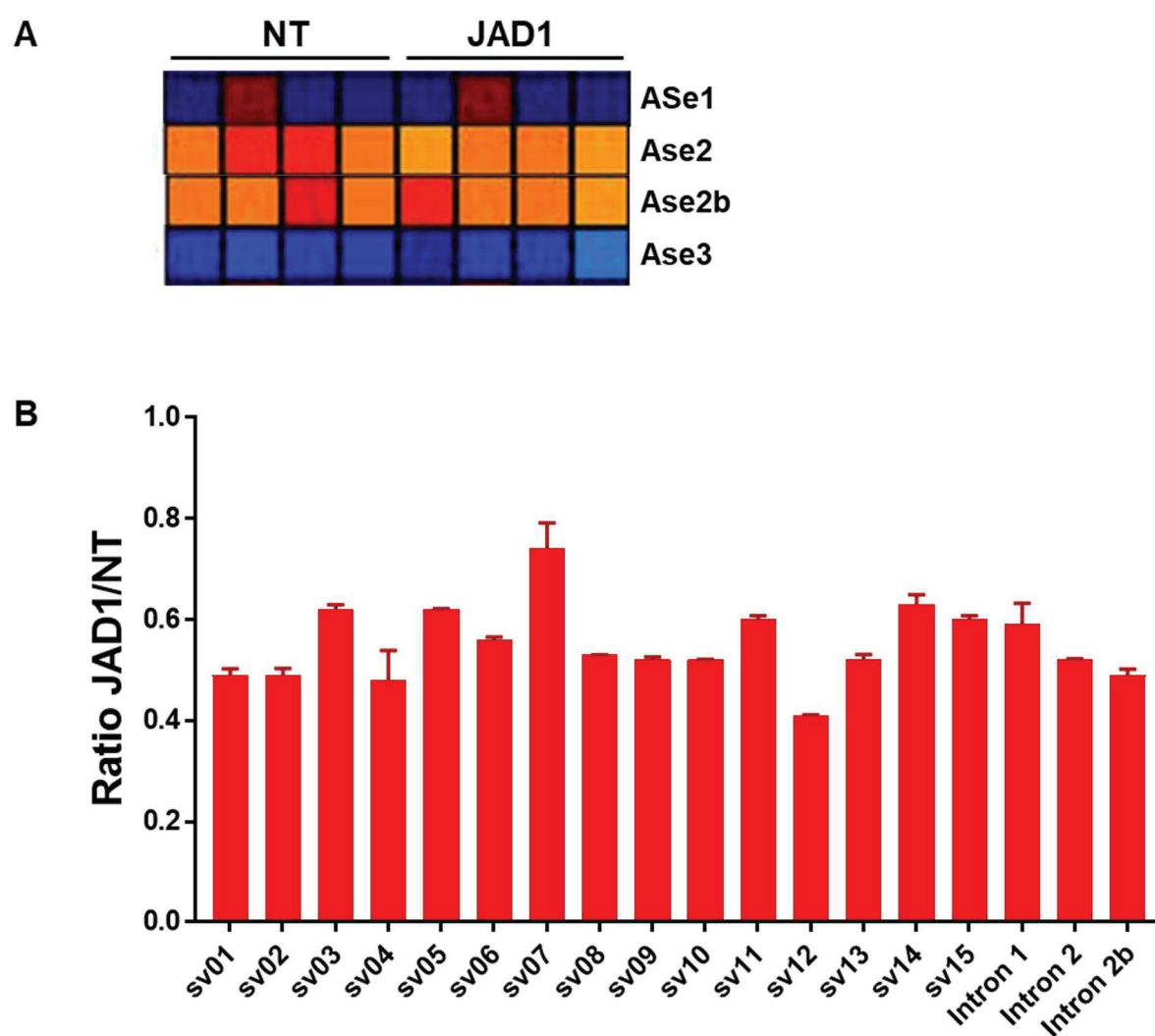
**Figure 62 : Effet de l'arrêt du traitement de JAD1 sur la reprise de la réplication d'HBV (genotype D) dans les cellules dHepaRG.**

Les cellules ont été infectées par HBV (genotype D) à une MOI des 250 vge/cellule. Elles ont été traitées 4, 7 et 9 jours après infection par les molécules indiquées à une concentration de 10µM, puis récoltées 28 jours post-infection. Les antigènes (A) HBs et (B) HBe sécrétés dans le surnageant ont été quantifiés par ELISA tous les deux jours. L'expérience a été réalisée une fois en quadruplicats.



### III.1.3. Effet de JAD1 sur l'épissage d'HBV

Les résultats ont montré que JAD1 a un effet sur la réplication d'HBV, au niveau des ARN. Comme JAD1 affecte la phosphorylation, et donc l'activité et la localisation de facteurs importants de l'épissage, nous avons analysé son effet sur l'épissage des ARN viraux. Pour cela, les cellules dHepaRG ont été infectées puis traitées par JAD1 selon le protocole indiqué dans la figure 57A. Onze jours après l'infection, les ARN viraux ont été analysés pour déterminer le niveau d'épissage des régions « Ase » des transcrits viraux et le ratio de chaque transcrite lors du traitement en comparaison au contrôle (Figure 63). L'analyse par AS-PCR indique que le traitement par JAD1 ne



**Figure 63. Effet de JAD1 sur l'épissage d'HBV.**

Des cellules dHepaRG ont été infectées par HBV pendant 16h à une MOI de 250 vge/cellule puis traitées 4 jours après l'infection par JAD1 selon le protocole décrit dans la figure 56A. Les cellules ont été récoltées 11 jours après l'infection. (A) Les ARN extraits des lysats cellulaires totaux ont été soumis à l'analyse AS-PCR. (B) Chaque transcrite d'HBV épissé ou non a été quantifié par RT-qPCR. L'expérience a été répétée deux fois en triplicat biologiques.

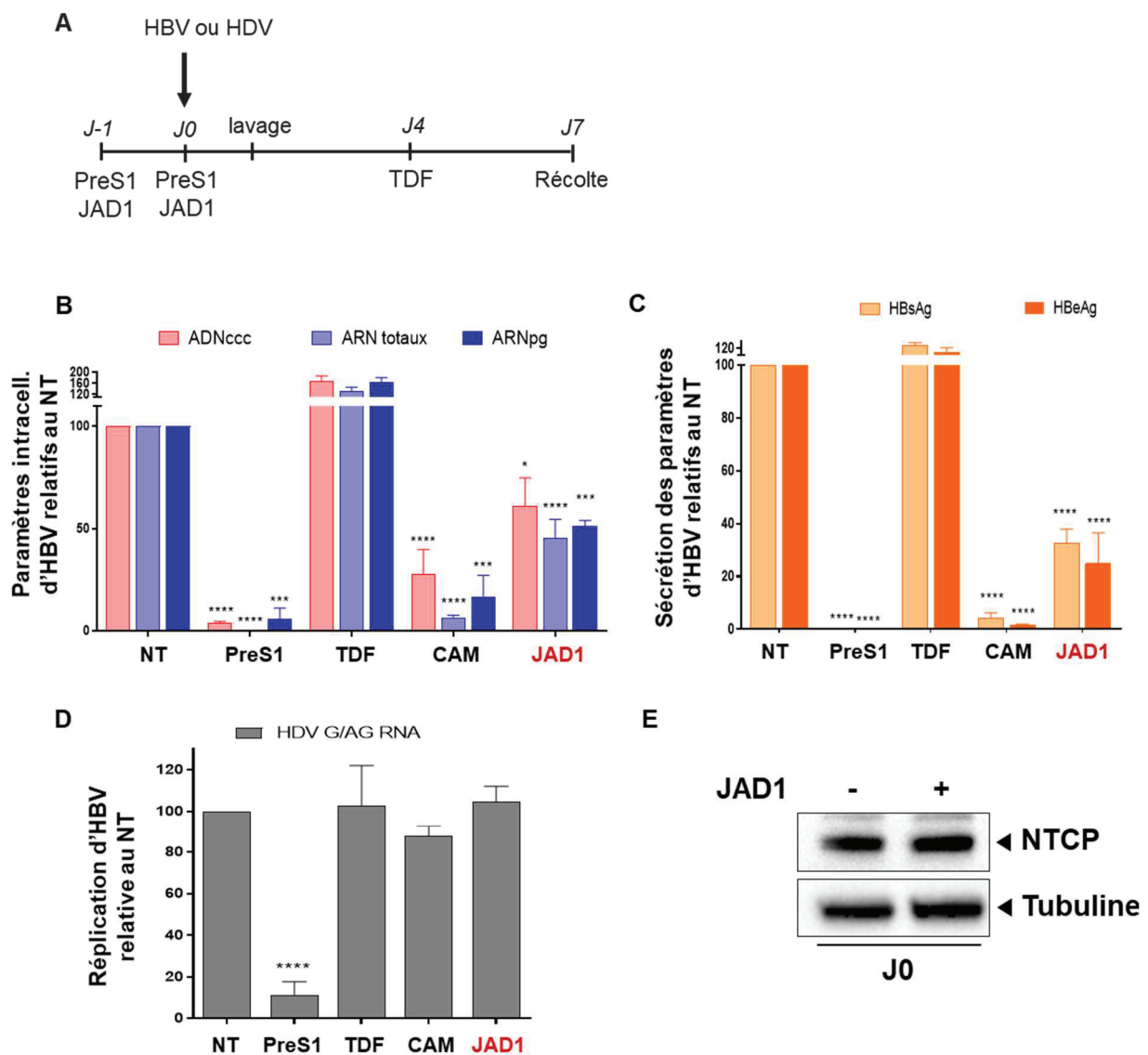
module pas de façon significative le niveau d'épissage global des ARN d'HBV (Figure 63A). La quantification de chaque transcrite indique une diminution globale de tous les transcrits d'HBV, épissés ou non, lors du traitement par JAD1 (Figure 3B). Ces résultats confirment l'effet de JAD1 sur la diminution des ARN viraux et révèle un effet homogène sur tous ces transcrits, suggérant que JAD1 ne module pas l'épissage des ARN viraux.

Ainsi, le traitement par JAD1 des hépatocytes infectés par HBV induit une forte diminution de la réplication virale. L'ADNccc n'étant pas affecté, cet effet s'exerce vraisemblablement au niveau de la synthèse, l'export et/ou la stabilité des ARN viraux. Un effet sur l'épissage de ces ARN viraux ayant été exclu, il conviendra tout de même d'évaluer l'effet de JAD1 sur l'épissage des ARN cellulaires dans le modèle hépatocytaire. Nos données suggèrent également que JAD1 aurait un effet pan-génotypique.

### **III.2. Effet de JAD1 sur l'établissement de l'infection par HBV**

Dans une seconde approche, nous avons voulu évaluer l'impact de JAD1 sur l'établissement de l'infection par HBV, en comparaison avec des inhibiteurs de l'entrée du virus ou de CAM qui peuvent réduire drastiquement l'établissement de l'infection et en particulier celui de l'ADNccc. Le peptide PreS1 (Myrcludex®) inhibe l'entrée des virions par interaction compétitive avec le récepteur NTCP d'HBV (321). Les CAM, développées pour leur effet sur l'assemblage de la capside, ont aussi un effet lors de l'entrée du virion dans l'hépatocytes, vraisemblablement en interférant avec le transport de la capside vers le noyau (484). Le TDF a été aussi utilisé comme contrôle n'affectant pas la formation de l'ADNccc.

Des cellules dHepaRG ont été traitées par JAD1, l'inhibiteur d'entrée ou la CAM, avant et pendant l'inoculation d'HBV, puis récoltées 7 jours après infection (Figure 64A). Lors d'une infection par HBV (génotype D), JAD1 induit une diminution importante de l'ADNccc, d'environ 40%. JAD1 impacte donc l'établissement de l'infection bien que de façon moindre comparé à l'inhibiteur d'entrée (Peptides PreS1) et au CAM (Figure 64B). Comme attendu, la réduction en ADNccc, entraîne une baisse



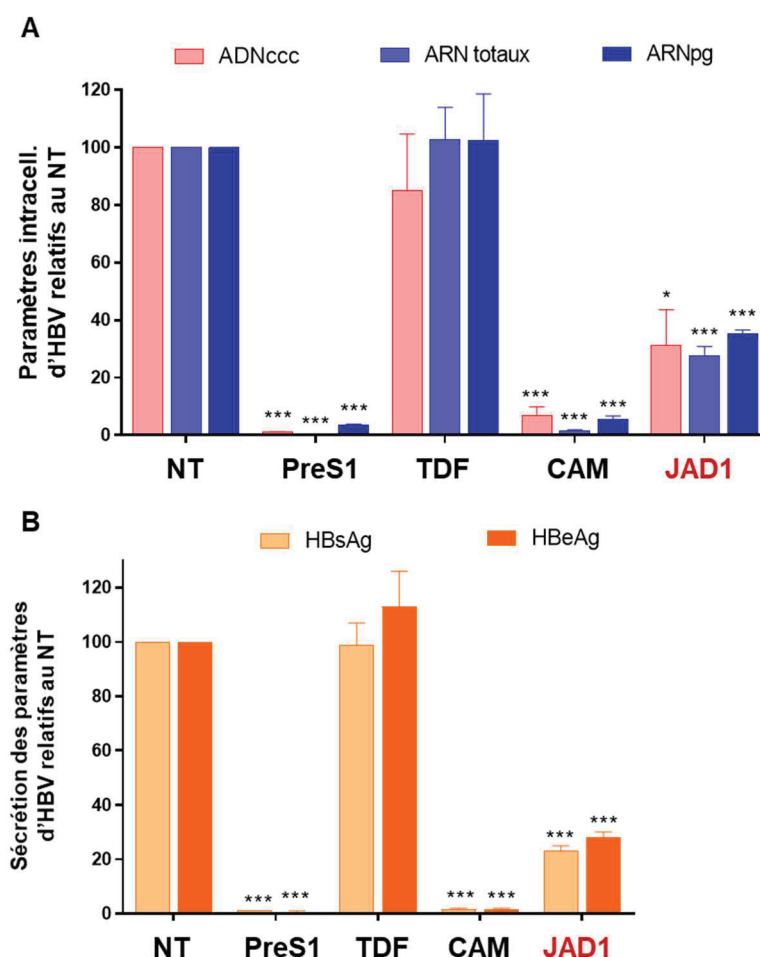
**Figure 64. Effet de 1C8 sur l'établissement de l'infection HBV dans des cellules HepaRG (Génotype D).**

(A) Des cellules dHepaRG ont été traitées avant et pendant l'infection avec les molécules indiquées à 10 $\mu$ M (JAD1 et CAM) ou à 100nM (Peptide PreS1). Les infections par HBV (génotype D) et HDV (génotype 1) ont été réalisées à une MOI de 250 vge/cellule et 25 vge/cellule, respectivement. Le traitement au TDF (10 $\mu$ M) a été effectué 4 jours post-infection. Les cellules ont été récoltées 7 jours après l'infection. (B) A partir des extraits cellulaires totaux, l'ADNccc, les ARN totaux d'HBV ou l'ARNpg ont été quantifiés par (RT)-qPCR. (C) Les antigènes HBs et HBe sécrétés dans le surnageant ont été quantifiés par ELISA. (D) Les ARN intracellulaires d'HDV ont été quantifiés par RT-qPCR. (E) Les extraits protéiques à J0 ont été soumis à un Western blot pour détecter le récepteur NTCP avec l'anticorps primaire correspondant. 3 expériences indépendantes ont été réalisées en quadruplat. L'analyse statistique a été réalisée avec un test de Mann-Whitney avec les significativités suivantes : \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

de tous les paramètres viraux en aval d'environ 70% (Figure 64B et C). Dans les mêmes conditions expérimentales, JAD1 ne bloque pas l'entrée et l'établissement d'HDV (qui possède la même enveloppe qu'HBV et donc entre dans les hépatocytes selon les mêmes modalités) (Figure 63D). De plus, la détection du récepteur NTCP

par Western blot au moment de l'infection indique que le traitement par JAD1 n'affecte pas sa synthèse (Figure 64E). Ces données suggèrent que l'internalisation des particules virale est maintenue après le traitement par JAD1.

L'effet de JAD1 sur l'inhibition de l'établissement de l'infection par HBV a été aussi confirmé avec le génotype C, montrant une réduction d'environ 70% sur tous les paramètres viraux y compris de l'ADNccc (Figure 65). Ces résultats indiquent une spécificité d'action de JAD1 vis-à-vis d'HBV en inhibant les étapes précoces du cycle viral en amont de la transcription des ARN viraux. Ils suggèrent aussi que le traitement par JAD1 avant l'infection n'affecte pas l'entrée des virions dans la cellule mais plutôt la formation et/ou la stabilité de l'ADNccc.



**Figure 65. Effet de 1C8 sur l'établissement de l'infection HBV dans des cellules HepaRG (Génotype C).**

Des cellules d'HepaRG ont été traitées avant et pendant l'inoculation par HBV (Génotype C : MOI=250 vge/cellule) selon le protocole indiqué figure 63A. (A) A partir des extraits cellulaires totaux, l'ADNccc, les ARN totaux d'HBV ou l'ARNpg ont été quantifiés par (RT)-qPCR. (B) Les antigènes HBs et HBe sécrétés dans le surnageant ont été quantifiés par ELISA. 2 expériences indépendantes ont été réalisées en quadruplicat. L'analyse statistique a été réalisée avec un test de Mann-Whitney avec les significativités suivantes : \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$

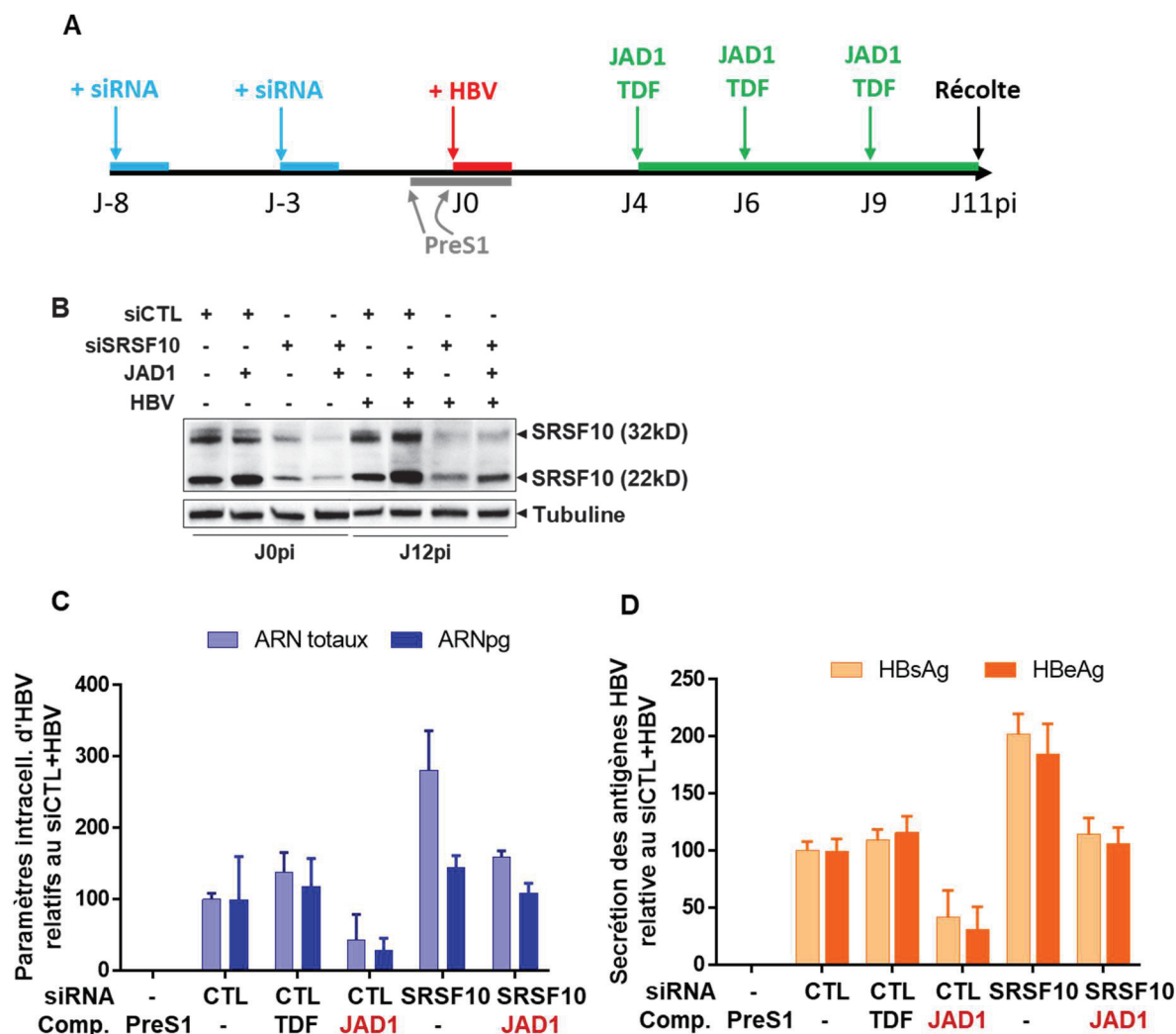
Ainsi, en plus d'affecter la réplication d'HBV, lorsque celle-ci est déjà établie, JAD1 altère aussi l'établissement de l'infection en inhibant la formation de l'ADNccc. La déplétion de SRSF10 n'affectant pas l'établissement de l'infection par HBV (Figure 47), ces résultats suggèrent que JAD1 module la phosphorylation d'autres protéines SR en plus de SRSF10, et que les protéines SR interviennent à plusieurs étapes de l'infection par HBV. L'activité antivirale de JAD1 devra être confirmée par des études *in vivo* dans des modèles de souris infectées par HBV.

### **III.3. Effet conjoint de JAD1 et SRSF10 sur la réplication d'HBV**

Comme indiqué précédemment JAD1 a été identifié comme un inhibiteur de la phosphorylation de SRSF10 (259). De façon surprenante, les expériences réalisées avec des siSRSF10 ou JAD1 ont montré un effet opposé sur la réplication d'HBV, les premiers conduisant à une augmentation (effet pro-viral du siRNA) alors que le second entraîne une inhibition de celle-ci (effet anti-viral de JAD1). Ce résultat à première vue contradictoire peut s'expliquer si on considère que c'est la forme déphosphorylée de SRSF10 (donc celle inhibitrice d'épissage) qui exerce un effet antiviral et que la forme phosphorylée n'a pas d'activité sur HBV : ainsi la déplétion en SRSF10 permet de réduire toutes les formes de SRSF10 qu'elles soient phosphorylées ou pas, résultant en un effet pro-viral, alors que le traitement par JAD1 augmente le niveau en forme déphosphorylée, résultant en un effet anti-viral.

Afin de mieux comprendre le mode d'action de JAD1, nous avons testé son effet sur la réplication virale en présence ou non des siRNA SRSF10. Pour cela, des cellules dHepaRG ont été transfectées par des siRNA CTL ou des ciblant SRSF10 avant l'infection par HBV. Quatre jours après infection, les cellules ont été traitées avec du TDF ou JAD1 comme précédemment décrit (Figure 66A). L'efficacité d'inhibition de synthèse de SRSF10 a été vérifiée par Western blot (Figure 66B). Comme attendu, le traitement par JAD1 seul diminue l'accumulation des ARN d'HBV et la sécrétion des antigènes, alors que l'inactivation de SRSF10 augmente ces mêmes paramètres. Le TDF n'a, comme attendu, pas d'effet sur les ARN d'HBV ni sur la sécrétion des antigènes viraux. En présence du siSRSF10 et de JAD1 les paramètres viraux reviennent au niveau observé en l'absence de traitement (Figure 66C et D).

Cependant, si l'effet de JAD1 était exclusivement dépendant de SRSF10 on aurait pu s'attendre à revenir à un niveau de réplication similaire à celui observé en présence des siRNA SRSF10.



**Figure 66. Effet de JAD1 sur la réplication d'HBV en présence ou non de SRSF10.**

(A) Des cellules dHepaRG ont été transfectées par des siRNA ciblant SRSF10 ou CTL selon le protocole d'écrit dans le figure 34A. Les cellules ont été infectées par HBV par HBV (genotype D) à une MOI de 250 puis traitées selon le protocole décrit dans la figure 56A. (B) Analyse du niveau de détection de SRSF10 par Western blot. (C) A partir des extraits cellulaires totaux, l'ADNccc, les ARN totaux et l'ARNpg d'HBV ont été quantifiés par (RT)-qPCR 12 jours après infection. (D) Les antigènes HBs et HBe sécrétés dans le surnageant ont été quantifiés par ELISA. Une seule expérience a été réalisée en quadruplat.

Bien que ces résultats doivent être confirmés par des nouvelles expériences, nous en concluons que l'effet anti-viral de JAD1 sur HBV ne semble que partiellement dépendant de son activité sur SRSF10. D'autres protéines cibles, également affectées

par l'activité de JAD1, pourraient contribuer avec SRSF10 à l'effet anti-viral de ce composé. Une hypothèse alternative serait que SRSF10 est bien la seule cible responsable de l'effet anti-viral de JAD1, mais que la déplétion de SRSF10 par les siRNA aurait des effets additionnels indirects, comme par exemple la dégradation d'autres protéines pouvant interagir avec SRSF10 et contribuant à son activité répressive.

En conclusion, cette étude suggère que le niveau de phosphorylation des protéines SR contrôle de façon déterminante l'établissement de l'infection par HBV et le maintien de sa réplication. Nous avons montré que JAD1 est un nouveau composé antiviral ciblant l'hôte (HTA) qui agit à des étapes du cycle viral différentes de celles ciblées par d'autres molécules telles que le TDF et les CAM et qui, de plus, semble capable d'une activité pan-génotypique vis-à-vis d'HBV. Des études additionnelles seront nécessaires pour déterminer quelle est la kinase inhibée par JAD1 et quelles sont ses cibles, en plus de SRSF10. Des études mécanistiques devront aussi être réalisées pour préciser ses effets sur l'établissement de l'ADNccc et le métabolisme des ARN viraux.

# DISCUSSION

Notre étude protéomique, visant à élucider les fonctions nucléaires de la protéine de capsid Core du virus de l'Hépatite B, suggère que celle-ci s'associe majoritairement à des protéines de liaison aux ARN (RBP) dans le noyau des hépatocytes humains. En particulier, les RBP impliquées dans l'épissage des ARNm sont fortement représentées parmi les facteurs interagissant avec Core. Trois de ces RBP, SRSF10 d'une part, et RBMX et TRA2 $\beta$  d'autre part, ont des effets opposés sur l'établissement et la réplication d'HBV, en intervenant à différents niveaux du cycle viral. Ces analyses nous ont conduits à l'identification d'un composé chimique, déjà connu pour cibler la phosphorylation de certaines protéines SR, qui exerce un effet anti-viral en inhibant l'établissement et la réplication d'HBV.

## **Etablissement de l'interactome de Core : une forte représentation des protéines de liaison aux ARN**

L'analyse protéomique des complexes associés à Core dans le noyau des hépatocytes humains a permis d'identifier une cinquantaine de partenaires cellulaires significativement enrichis parmi les facteurs co-purifiés avec Core. Une étude bioinformatique a permis de mettre en évidence que ces partenaires sont principalement des facteurs de liaison aux acides nucléiques et, en particulier, des protéines de liaison aux ARN qui représentent environ un quart des protéines identifiées (Figure 26B). Plus précisément, nous avons mis en évidence que 11 protéines, impliquées dans l'épissage des ARNm *via* le spliceosome, constituent un réseau central fortement interconnecté à de nombreuses autres protéines de l'interactome de Core, qui ont aussi des fonctions dans l'épissage des ARN (Figure 28).

Ces résultats suggèrent que l'une des fonctions régulatrices majeures de Core, dans le noyau des hépatocytes, serait de contrôler le métabolisme des ARN viraux et/ou cellulaires *via* son association avec des facteurs d'épissage. Ce résultat semble de prime abord surprenant puisque l'épissage n'est pas indispensable à la réplication d'HBV (437,442). En effet, lors de sa réplication, les sept protéines virales nécessaires et suffisantes à un cycle productif d'HBV sont toutes traduites à partir d'ARN non



épissés (336). Cependant, plusieurs ARN viraux épissés sont produits lors du cycle infectieux d'HBV et, bien qu'ils ne soient pas nécessaires pour la réplication virale, des études ont montré qu'ils seraient impliqués dans la pathogenèse associée à l'infection chronique par HBV (332,460,472). Par ailleurs, il est possible que les activités régulatrices de Core soient majoritairement destinées à réguler l'épissage de gènes cellulaires pour favoriser la réplication virale. Enfin, comme décrit dans l'introduction, il ne faut pas oublier que les facteurs d'épissage peuvent également intervenir dans les étapes de transcription, de stabilité ou de transport des ARN et aussi dans d'autres processus biologiques comme la réponse aux dommages à l'ADN. Le virus pourrait détourner ces fonctions par l'intermédiaire d'HBc afin d'optimiser la réplication virale.

Avant notre étude, très peu de protéines avaient été décrites comme pouvant interagir avec Core. Parmi celles-ci, PRMT5 et APOBEC3B ont été décrites comme interagissant avec Core dans le noyau des cellules. PRMT5 induit la méthylation de Core et régule épigénétiquement l'ADNccc (418,419). L'interaction de Core avec APOBEC3B permettrait à cette cytidine déaminase d'agir sur l'ADNccc, et cette interaction pourrait être ARN dépendante (4,485). Ces deux partenaires n'ont pas été identifiés dans notre analyse. Cela peut s'expliquer par le fait que l'interaction entre APOBEC3B et Core a été mise en évidence dans un contexte de surexpression de cette protéine cellulaire, ce qui n'est pas le cas dans notre modèle. Par ailleurs, le fractionnement nucléaire réalisé dans notre étude élimine la fraction chromatinienne. Il est donc possible que, même après traitement à la benzonase, PRMT5 ait été éliminée lors des étapes de centrifugation effectuées lors de la purification des extraits nucléaires solubles. Enfin, il ne faut pas oublier que notre analyse a été réalisée dans un contexte non infectieux, donc, en l'absence d'ADNccc, cible de ces deux partenaires de Core. La présence d'ADNccc et/ou d'autres facteurs viraux pourrait être requise pour l'interaction entre Core et PRMT5 ou APOBEC3B. Il sera donc important de réaliser le protéome de Core dans des cellules infectées par HBV pour déterminer si des facteurs nucléaires déjà connus pour agir sur l'ADNccc *via* Core sont bien retrouvés. De plus, l'analyse protéomique en présence d'HBV pourra apporter des informations ultérieures sur une éventuelle modulation quantitative et qualitative des partenaires de Core en présence des autres constituants du virus et, ainsi, préciser les fonctions nucléaires de cette protéine de capsid virale. On peut émettre

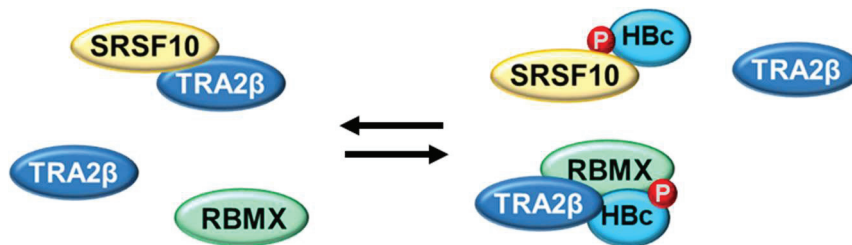
l'hypothèse que Core, qui est présente dès la libération du génome viral (ADNrc) dans le noyau de l'hépatocyte, pourrait intervenir dans le recrutement de facteurs cellulaires nécessaires au virus, en particulier ceux requis pour la formation de l'ADNccc. Certaines de ces d'interactions ne pourraient être visibles que suite à l'infection virale et non lors de l'expression de Core seule. De plus, l'infection par HBV pourrait moduler les modifications post-traductionnelles de Core, en particulier sa phosphorylation, qui pourraient jouer un rôle important dans l'interaction de cette protéine virale avec certains facteurs cellulaires.

De façon intéressante, Core possède une région riche en sérines et en arginines (288,353) semblable à celle présente dans les protéines SR, dont certaines ont été identifiées dans notre protéome de Core (SRSF1, 2, 5, 10, TRA2 $\alpha$  et TRA2 $\beta$ ). Ces protéines ont une localisation variable dans le noyau cellulaire, au niveau des Speckles, des sites de transcription et d'épissage, et certaines interviennent dans la prise en charge des ARN pour leur export vers le cytoplasme (42,98). Ainsi, Core pourrait interagir avec ces protéines pour modifier leurs fonctions, peut-être en agissant elle-même comme une protéine SR. Les protéines hnRNP appartiennent à l'autre famille type de RBP impliquées dans l'épissage, et deux d'entre elles, RBMX et hnRNPA0, sont présentes dans les complexes protéiques associés à Core. Afin de préciser le rôle de ces protéines dans l'infection par HBV, nous nous sommes concentrés sur deux représentants des familles SR et hnRNP les plus enrichis dans le protéome de Core : SRSF10 et RBMX. Nous avons aussi étudié le rôle de TRA2 $\beta$ , un partenaire commun à ces deux RBP, décrit comme pouvant moduler leurs fonctions d'épissage.

### **SRSF10, RBMX et TRA2 $\beta$ sont impliqués à différents niveaux du cycle réplcatif d'HBV**

L'interaction de Core avec SRSF10 et RBMX a été mise en évidence dans un contexte non infectieux. Par la suite des expériences de colP réalisées dans des hépatocytes infectés par HBV ont permis de montrer que cette interaction a aussi lieu dans un contexte infectieux (Figure 31). Cependant, l'essai double hybride chez la levure n'a pas mis en évidence d'interaction directe entre Core d'une part, et SRSF10 ou RBMX d'autre part (Annexe 1). Bien que ces résultats ne permettent pas d'affirmer une absence d'interaction directe entre ces facteurs dans des cellules de mammifère,

ils suggèrent que l'interaction de Core avec ces deux protéines serait médiée par d'autres facteurs cellulaires, tel que TRA2 $\beta$ , et/ou par des PTM spécifiques de Core ou de ses partenaires. Les données de la littérature disponibles sur ces trois partenaires indiquent en effet que leurs interactions seraient contrôlées par leur phosphorylation : l'hypo-phosphorylation de SRSF10 favorise son interaction avec TRA2 $\beta$  (259,477). Dans le cas de RBMX, son interaction directe avec TRA2 $\beta$  serait au contraire favorisée par la phosphorylation (478). On peut alors émettre l'hypothèse que Core, qui est aussi la cible de nombreuses kinases, pourrait interagir avec ces facteurs préférentiellement lorsqu'ils sont dans un état phosphorylé et ainsi contrôler leurs fonctions (Figure 67).



**Figure 67. Modèle hypothétique d'interaction entre Core et les facteurs cellulaires SRSF10, RBMX et TRA2 $\beta$ .**

L'étude du rôle de SRSF10, RBMX et TRA2 $\beta$  dans l'établissement et la réplication d'HBV a été réalisée grâce à une invalidation de ces facteurs par siRNA, réalisée avant ou après l'infection virale. La mesure de divers paramètres viraux dont en particulier le niveau en ADNccc et en ARN viraux nous a ensuite permis de déterminer si ces facteurs pouvaient intervenir dans les étapes précoces ou tardives du cycle viral. Les résultats sont schématiquement représentés dans le Tableau 2.

Protéine invalidée	Transfection	ADNccc	ARN viraux	Ag secrétés	Figure
SRSF10	Avant HBV	-	↗↗	↗↗	47
	Après HBV	-	↗	↗	49AB
RBMX	Avant HBV	↘↘	↘↘	↘↘	48
	Après HBV	-	↘	-	49CD
TRA2 $\beta$	Avant HBV	↘↘	↘↘	↘↘	51AB
	Après HBV	-	↘	-	51CD

**Tableau 2. Effet de la déplétion de SRSF10, RBMX ou TRA2 $\beta$  sur les paramètres viraux, avant ou après l'infection par HBV.**

Ces expériences, réalisées dans deux modèles d'hépatocytes humaines (cellules dHepaRG et PHH), ont permis de mettre en évidence que ces facteurs agissent de façon différentielle sur le cycle d'HBV avec des conséquences opposées sur sa réplication. En particulier, les résultats que nous avons obtenus suggèrent que SRSF10 serait un facteur antiviral, impliqué dans le métabolisme des ARN d'HBV mais pas dans les étapes précoces de l'infection contrôlant la formation et l'accumulation d'ADNccc. Au contraire, RBMX et TRA2 $\beta$  semblent avoir une action provirale, préférentiellement au niveau de la formation et/ou la stabilité de l'ADNccc et, dans une moindre mesure, dans le métabolisme des ARN viraux lorsque l'infection est établie (Figure 68).

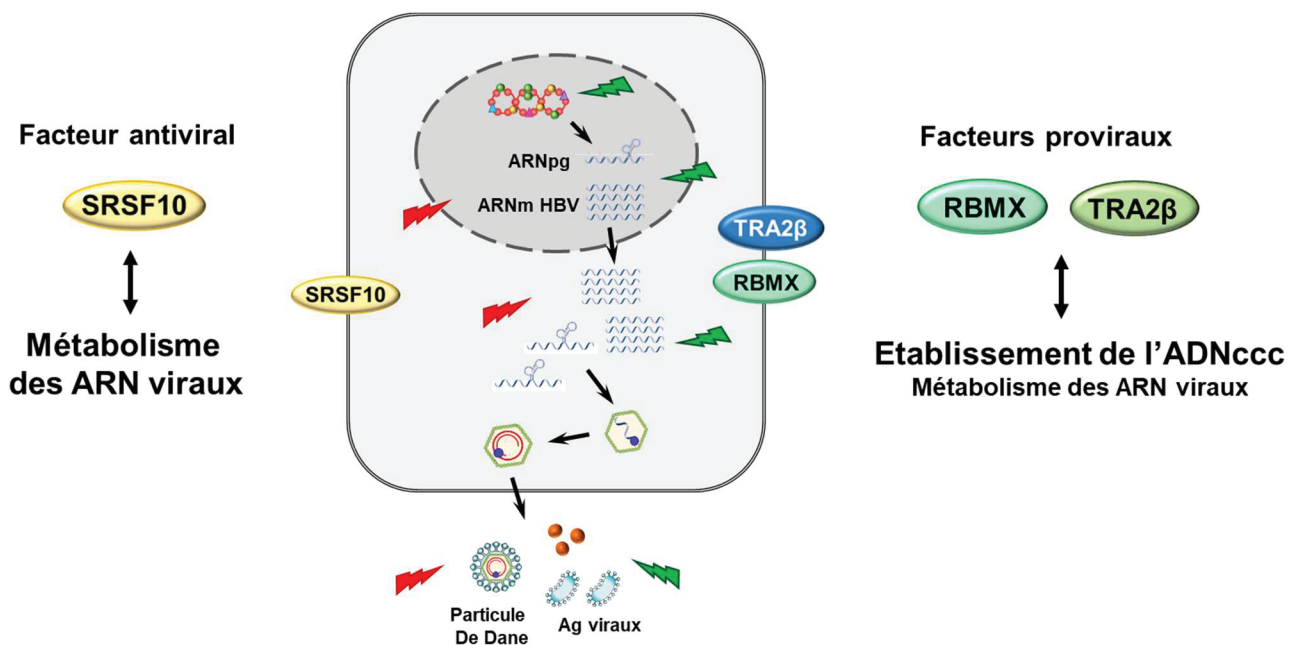


Figure 68. Effets des facteurs SRSF10, RBMX et TRA2B sur le cycle infectieux d'HBV déduits des expériences de transfection de siRNA.

Etant donné le rôle prépondérant de ces facteurs dans l'épissage des ARN cellulaires, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle SRSF10 et RBMX pourraient réguler l'épissage d'HBV, en permettant l'équilibre nécessaire entre ARN épissés et non épissés. De façon surprenante, l'analyse de l'indice d'épissage des régions introniques des transcrits d'HBV et la quantification de chaque transcrits épissés et non épissés d'HBV, n'a pas permis de mettre en évidence un effet de la déplétion en SRSF10 et RBMX dans l'épissage viral (Figure 55).

La protéine SRSF10 a été exclusivement décrite pour ses fonctions d'épissage, en tant que répresseur ou activateur de l'épissage de nombreuses ARN cellulaires impliqués dans la différenciation cellulaire ou la DDR, et aussi dans l'épissage des ARN d'HIV-1 (83,85,189,259). Il faut aussi rappeler que SRSF10 entre dans la composition des Paraspeckles et, bien que leurs fonctions soient encore mal connues, ces corps nucléaires pourraient être impliqués dans la réponse anti-virale (18,127).

Nos résultats suggèrent que SRSF10 régule de façon négative la quantité d'ARN HBV et plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer cet effet. Premièrement, même si cela n'a pas encore été démontré, il est possible que SRSF10 puisse être impliqué dans le contrôle de la transcription et/ou de la stabilité des ARN d'HBV. Ces hypothèses pourront être vérifiées par des expériences de CHIP visant à déterminer les marques épigénétiques de l'ADNccc et par des analyses de la stabilité des ARN viraux, lorsque SRSF10 est présent ou absent. Nous avons récemment établi des lignées stables de cellules HepaRG exprimant une protéine SRSF10 fusionnée à une étiquette HA, dans sa forme sauvage ou mutée dans les domaines RS ou RRM. Cet outil nous permettra de contourner l'absence d'anticorps anti-SRSF10 fonctionnels en IP et de regarder si ce facteur peut se fixer à l'ADNccc ou aux ARN d'HBV. Une deuxième hypothèse, non exclusive, serait que SRSF10 pourrait avoir un effet antiviral du fait de son action sur l'épissage des transcrits cellulaires, en activant et/ou réprimant l'épissage de transcrits codants pour des protéines agissant de façon directe ou indirecte sur la réplication virale.

Core pourrait interagir avec SRSF10 pour contrecarrer son effet anti-viral. La capacité de Core à neutraliser les effets de SRSF10 expliquerait pourquoi la transfection de siRNA ne permet d'augmenter que modestement la réplication virale. Une hypothèse intéressante est que Core pourrait réguler les activités délétères de SRSF10 sur le virus en modulant son niveau de phosphorylation, PTM qui contrôle de façon critique l'activité différentielle de SRSF10 sur l'épissage (75,80). Par exemple, il a été montré qu'un choc thermique induit la dissociation du complexe formé par SRSF10 et les protéines 14-3-3 qui protègent SRSF10 de la déphosphorylation. La déphosphorylation de SRSF10 qui en résulte, est associée à son activité répressive (79). Lors de l'infection virale, Core pourrait se lier à SRSF10 phosphorylé afin de contrebalancer la perte d'un tel facteur et donc empêcher sa déphosphorylation délétère pour la réplication virale. Il est également envisageable que l'infection par

HBV puisse contribuer à neutraliser l'effet répresseur de SRSF10 en induisant sa phosphorylation. Nous sommes actuellement en train de réaliser des analyses de phospho-protéomique pour regarder l'impact de l'infection par HBV sur la phosphorylation des protéines cellulaires et, en particulier celle des protéines SR dont SRSF10. Par ailleurs, l'obtention récente des lignes stables de cellules HepaRG exprimant des protéines HA-SRSF10 mutées au niveau des deux résidus sérine connus pour être la cible de kinases (Ser131 et Ser133), nous permettra de déterminer l'impact de la phosphorylation de SRSF10 sur la fixation éventuelle de ce facteur à Core, à l'ADNccc et/ou aux ARN d'HBV.

Concernant RBMX, nos résultats suggèrent que cette protéine interviendrait dans les étapes précoces du cycle viral, puisque sa déplétion avant l'infection des héparocytes réduit le niveau en ADNccc, ce qui conduit à une diminution de la réplication virale. Nos analyses du niveau d'expression du récepteur NTCP suggèrent que RBMX n'interviendrait pas dans l'entrée du virus mais plutôt au niveau de la formation ou de l'accumulation de l'ADNccc. Une analyse préliminaire visant à quantifier l'accumulation de l'ADNccc dans le noyau de cellules HepaRG infectées par HBV, en présence ou en absence de RBMX, suggère que cette protéine interviendrait dans la formation de l'ADNccc puisque sa quantité est diminuée dès J1 post-infection en l'absence de RBMX (données non montrées). D'autres analyses sont cependant requises pour valider cette observation. Un tel effet de RBMX sur la formation de l'ADNccc pourrait s'expliquer par les fonctions connues de RBMX dans les mécanismes de réparation de l'ADN. En effet, RBMX possède des rôles directs, à la fois sur le signalement des dommages à l'ADN (169) mais aussi dans la protection des extrémités d'ADN libres vis-à-vis de la résection par des exonucléases (209). Une hypothèse qui émerge consiste à envisager que RBMX serait recruté par Core sur l'ADNrc et interviendrait lors de sa conversion en ADNccc peut-être en le protégeant de l'action d'exonucléases. Des expériences préliminaires de CHIP n'ont pas permis de détecter la présence de RBMX sur l'ADNccc (données non montrées). Cette absence de détection pourrait être due au fait que cette protéine n'intervient que précocement et de façon transitoire sur l'ADNrc. Le recrutement de RBMX sur les sites d'ADN endommagés a été lié à l'activité de PARylation de PARP1 (169), protéine que nous avons retrouvée associée de façon significative à Core (Figure 30). Dans notre

étude, des résultats préliminaires montrent que l'absence de PARylation entraîne une surexpression massive de RBMX et a le même effet que l'inhibition de RBMX par siRNA (Figure 50). Cela suggère que la PARylation contrôle l'expression de RBMX et pourrait être impliqué dans l'effet de RBMX sur HBV. Cependant, la PARylation touche de nombreuses autres cibles et son inhibition peut induire une accumulation de cassure qui pourrait être délétère pour le virus, ce qui expliquerait son effet antiviral. Par ailleurs, RBMX exerce également un effet indirect sur la réparation de l'ADN en contrôlant l'épissage des ARN codant pour des facteurs de réparation clés tels que RNF8 et BRCA2 (169). Ainsi une hypothèse alternative serait que ce facteur intervient dans la formation de l'ADNccc en régulant l'expression des facteurs de réparation cellulaires.

Enfin, TRA2 $\beta$  semble avoir le même effet sur l'établissement et la réplication d'HBV que RBMX. Aucun effet de TRA2 $\beta$  sur la réparation de l'ADN n'est à ce jour connu, à l'exception d'un effet indirect *via* l'épissage de CHEK1, une des kinases intervenant dans la réponse aux dommages à l'ADN, par l'intermédiaire de la voie ATR (184). De façon intéressante, nos données ainsi que celle d'autres équipes (486) indiquent que l'infection par HBV induirait une activation d'ATR, suggérant une implication de cette voie dans le recrutement des facteurs de réparation requis pour la formation de l'ADNccc. Ainsi, comme envisagé dans le cas de RBMX, TRA2 $\beta$  pourrait agir de façon indirecte sur la réplication d'HBV *via* l'épissage de CHEK1. L'effet de Core sur ces mécanismes, par l'intermédiaire de son interaction directe ou indirecte avec ces RBP reste à préciser.

Comme nous l'avons vu, pour ces trois facteurs cellulaires, une hypothèse qui revient régulièrement consiste à envisager un effet indirect sur HBV par l'intermédiaire d'une modulation de l'épissage des ARN cellulaires. Tremblay *et al.* ont montré que les CHC induits par HBV se caractérisent par une dérégulation majeure du profil d'épissage alternatif d'un grand nombre d'ARN cellulaires en comparaison avec des CHC induits par le virus de l'hépatite C (HCV) ou non viro-induits (487). Au-delà d'un effet direct sur HBV, les facteurs d'épissage recrutés par Core, en particulier SRSF10, RBMX et TRA2 $\beta$ , pourraient donc participer au changement du profil d'épissage des hépatocytes et permettre une meilleure réplication virale. Ces modifications pourraient

également constituer une des premières étapes de la transformation de la cellule vers un état tumoral. De ce point de vue, la protéine Core, du fait de sa capacité à contrôler l'activité des RBP, pourrait alors être considérée comme une protéine oncogène au même titre que le facteur HBx, par ailleurs défini comme un oncogène « faible ». Pour vérifier cette hypothèse, il sera intéressant d'étudier l'effet de l'infection par HBV ou de l'expression de Core sur l'épissage d'un certain nombre de cibles cellulaires déjà identifiées comme dérégulée dans le CHC associés à HBV. De la même façon, il sera ensuite possible de regarder l'effet de l'inactivation des trois RBPs pour déterminer leur contribution à ce processus.

### **Phosphorylation des protéines SR et réplication d'HBV**

Plusieurs hypothèses émises au sujet de l'effet de SRSF10 sur la réplication d'HBV invoquent la possibilité que Core et/ou HBV pourrait réguler la phosphorylation de ce partenaire pour contrôler ses activités. Comme indiqué dans l'Introduction, l'activité de SRSF10, comme celle de nombreuses autres protéines SR, est finement régulée par des événements de phosphorylation qui contrôlent leur localisation subcellulaire, leur fixation aux ARN et leurs activités d'épissage (42,80,149,259) (cf Introduction I.3.2 et I.4.2). Du fait de leur importance dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques, tels que la division et la différenciation cellulaire, la transformation tumorale et la réplication virale (42), de nombreuses études ont cherché à développer des inhibiteurs spécifiques de la phosphorylation des protéines SR afin de contrôler leur activité (259,488–490).

Le niveau de phosphorylation de SRSF10 permet à ce facteur d'agir soit comme un répresseur soit comme un activateur d'épissage. Une étude précédente avait permis de montrer que la phosphorylation de SRSF10 pouvait être inhibée grâce à un composé chimique, la molécule 1C8 (que nous avons renommé JAD1) et que cet effet pouvait inhiber la réplication du virus HIV-1 (257). L'utilisation de JAD1 dans des cellules infectées par HBV a montré que l'ajout de cette molécule avant ou après l'infection permet de réduire de façon significative la réplication virale (Figures 57 et 59). Ce résultat, qui est opposé à celui observé avec les siRNA SRSF10 pourrait s'expliquer par le fait que JAD1 induit la déphosphorylation de SRSF10 (Figure 56) qui aurait une action répressive sur le virus, alors que lors de l'utilisation du siRNA, toutes les formes de SRSF10, phosphorylées ou non, sont éliminées, levant ainsi la



répression sur la réplication d'HBV. Comme dans le cas de HIV-1, la phosphorylation de SRSF10 contrôlerait donc de façon critique son effet anti-viral.

Plusieurs questions se posent au sujet du mécanisme d'action de JAD1. La première et peut-être la plus importante, concerne les cibles directes de JAD1, à savoir la ou les kinases affectée(s). Dans l'étude décrivant l'effet de cette molécule sur HIV-1, il était suggéré que JAD1 pourrait agir sur l'activité de la kinase SRPK1 (259). Le résidu Sérine 133 de SRSF10 avait été identifié comme étant une des cibles de cet événement de phosphorylation (79,189). Cependant, d'autres kinases intervenant dans la phosphorylation des protéines SR pourraient également être ciblées. Des analyses avec des siRNA ou des inhibiteurs connus des principales kinases des protéines SR sont actuellement en cours pour déterminer leur effet sur HBV.

La deuxième question, qui découle de la précédente, concerne la ou les protéine(s) SR cible(s) de la (les) kinase(s) inhibée(s) par JAD1. L'étude de Shkreta *et al.*, suggérait une certaine spécificité de la molécule vis-à-vis de SRSF10 (259). Nos premiers résultats obtenus en cumulant les traitements par siRNA SRSF10 et JAD1 suggèrent que la molécule agirait bien *via* SRSF10 mais peut-être pas exclusivement. D'autres méthodes d'inactivation de SRSF10, en utilisant des mutants de phosphorylation ou de délétion des régions RS et RRM, pourraient fournir des informations complémentaires essentielles. Cependant, pour cela, il est d'abord nécessaire de générer des cellules incapables de produire la protéine SRSF10 endogène pour la remplacer par des formes de SRSF10 sauvage ou mutée. Nos premiers essais d'inactivation de ce gène par la technique de Crispr/Cas9 dans des cellules HepaRG (non différenciées) ne nous ont pas permis d'obtenir une inactivation stable de SRSF10. Il est possible, en effet, que la déplétion en SRSF10 soit incompatible avec une bonne différenciation des hépatocytes.

L'étude du phospho-protéome d'HBV en présence ou pas de la molécule JAD1 devrait nous fournir des indications importantes sur les cibles potentielles de cette drogue, en particulier concernant les protéines SR. Des études utilisant des siRNA ciblant plusieurs protéines identifiées dans le phosphoprotéome pourront alors nous permettre de mieux préciser les cibles de JAD1. Enfin, il ne faut pas oublier que Core lui-même est phosphorylé au niveau de son CTD, qui, du fait de sa composition en AA, présente une analogie avec les régions riches en arginines et sérines des protéines SR (288,353). Bien que la phosphorylation de Core ait été décrite

uniquement dans le cytoplasme des cellules infectées, lors de l'encapsidation de l'ARN viral, on ne peut exclure qu'elle ait également lieu dans le noyau et/ou que des formes phosphorylées de Core soient présentes dans ce compartiment cellulaire. Une hypothèse très attractive serait que JAD1 pourrait aussi réguler la phosphorylation de Core et, ainsi, contrôler son interaction avec d'autres partenaires cellulaires, sa localisation cellulaire, voire son activité de fixation à l'ADN ou l'ARN. Nous sommes actuellement en train de vérifier cela grâce à des tests de phosphorylation *in vitro* (réalisés par notre collaborateur B. Chabot) et des analyses des formes phosphorylées de Core dans le noyau des hépatocytes traités ou non par JAD1.

La troisième et dernière question concerne le mécanisme anti-viral mis en jeu par JAD1 dans le cas d'HBV. Contrairement à son effet sur HIV-1, l'analyse des ARN d'HBV extraits de cellules traitées par JAD1 n'a pas permis de montrer un effet sur l'épissage des transcrits viraux mais plutôt un effet inhibiteur global sur tous les ARN (Figure 63). Cela suggère que cette molécule pourrait agir au niveau transcriptionnel, peut-être en empêchant le recrutement de protéines SR sur les ARN d'HBV en cours de transcription, et/ou post-transcriptionnel, en contrôlant leur export, ou leur stabilité. Des analyses par ChIP sont en cours pour analyser l'effet de JAD1 sur la présence de marques épigénétiques activatrices ou répressives sur l'ADNccc. Si aucune modification n'est observée, des analyses d'export et de la stabilité des ARN seront effectuées. De plus, il sera important d'évaluer l'effet de JAD1 sur les transcrits des hépatocytes, en particulier l'effet sur leur épissage. Nous pourrions étudier l'impact de JAD1 sur l'épissage de cibles cellulaires connues de SRSF10 et TRA2 $\beta$  (comme Bcl-x et CHEK1 respectivement) et globalement sur un grand nombre de transcrits cellulaires, pour évaluer la spécificité d'action de JAD1. Enfin, lorsque les cellules sont incubées avec JAD1 avant l'infection par HBV, cela conduit à une diminution du niveau en ADNccc, qui évoque les effets observés avec les siRNA RBMX et TRA2 $\beta$  (Figure 64). De plus, JAD1 ne modifie pas l'expression du récepteur NTCP d'HBV (Figure 64). L'ensemble de ces résultats suggèrent que JAD1 pourrait aussi intervenir dans les étapes précoces de l'infection, avant l'établissement de l'ADNccc, peut-être en intervenant sur la phosphorylation des autres protéines SR et/ou d'autres facteurs cellulaires.

L'ensemble des résultats obtenus jusqu'à présent dans nos modèles infectieux *in vitro* (cellules HepaRG et PHH) suggèrent que JAD1 constitue un nouvel agent anti-

viral pan-génotypique, ciblant l'hôte. Un brevet a été déposé par notre groupe pour protéger l'utilisation de cette molécule contre l'infection par HBV (Annexe 2). Par la suite, nous envisageons de tester JAD1 dans des modèles murins dans lesquels l'infection par HBV a été établie grâce à l'utilisation de vecteurs AAV contenant le génome viral ou dans des souris immuno-déficientes, xeno-transplantées par des hépatocytes humains et infectées par HBV (491–493). Enfin, nos premières analyses *in vitro* montrent que JAD1 agit de façon différentielle en comparaison du TDF, des CAM ou d'un inhibiteur d'entrée d'HBV (Figures 69).

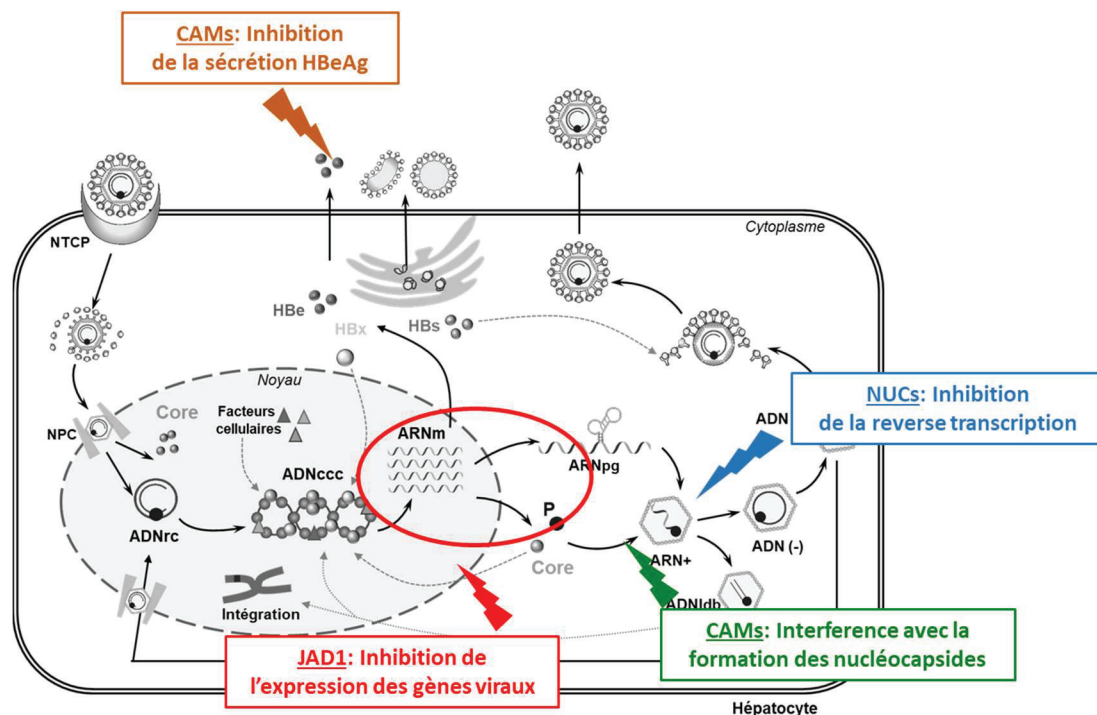


Figure 69. Effet différentiel de JAD1 comparé aux NUC et aux CAM

Ainsi, dans les modèles d'infection par HBV *in vivo* comme dans les études *in vitro*, il sera intéressant d'étudier l'effet de JAD1 lorsqu'il est combiné avec d'autres traitements anti-viraux comme l'IFN $\alpha$ , les NUC et les CAM. Cela permettra de déterminer si JAD1 peut exercer un effet synergique avec d'autres traitements anti-viraux et aussi d'analyser la durée de cet effet lorsque les traitements sont arrêtés (effet rebond).

## CONCLUSIONS

En conclusion, notre étude a permis de montrer que Core interagit avec plusieurs RBP qui ont vraisemblablement des rôles différents sur le cycle répliatif

d'HBV. L'interaction directe ou indirecte de Core avec ces facteurs pourrait avoir des conséquences multiples parmi lesquelles : 1) la régulation du profil d'épissage d'ARN cellulaires codant pour des facteurs contrôlant la réplication virale ; 2) des effets directs sur les étapes de formation de l'ADNccc et 3) des effets sur la transcription, l'export ou la stabilité des ARN viraux (Figure 70). L'ensemble de ces activités pourraient être contrôlées par la capacité de virus à moduler l'activité de kinases/phosphatases cellulaires comme démontré récemment par notre équipe dans le cas de la kinase PLK-1 (290). Enfin, ces activités pourraient aussi participer, de façon directe ou indirecte, à la modification de la physiologie de l'hépatocyte et contribuer à sa progression vers un état tumoral.

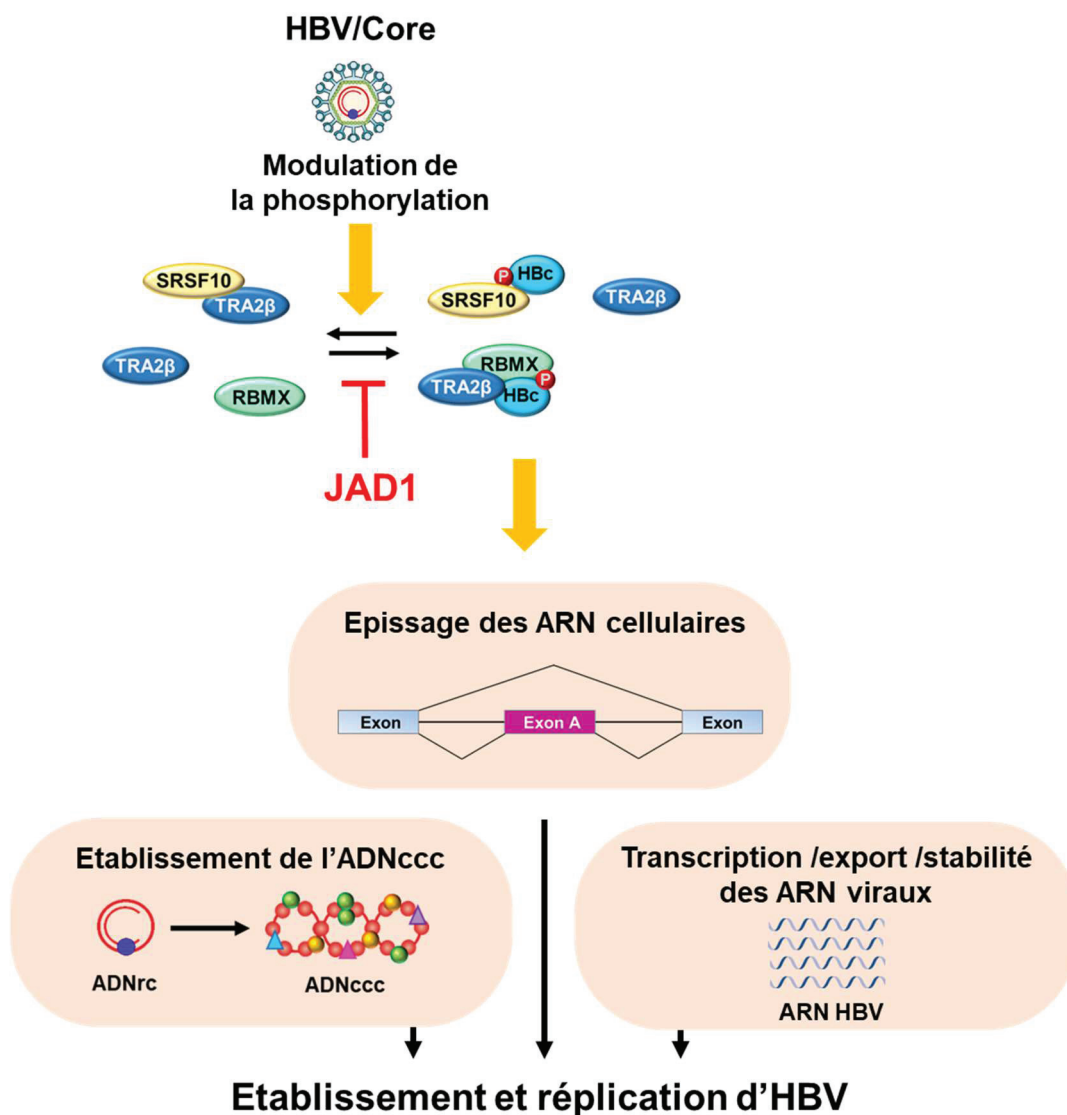


Figure 70 : Modèle hypothétique des effets de Core et/ou HBV sur l'activité des RBP

# MATERIELS ET METHODES

## Cellules

Les cellules progénitrices hépatocytaires humaines HepaRG décrites par Gripon *et al.* (494) ont été maintenues dans un milieu William's (Life Technologies) dans lequel a été ajouté 10% de sérum de veau fœtal (Fetal Bovin Serum, Perbio), 1% de pénicilline /streptomycine (500U/mL, Invitrogen), 1% de glutamine (GlutaMAX Invitrogen), 2,5mg/L d'hydrocortisone Upjohn (Serb laboratory), 5mg/L d'insuline (Sigma Aldrich). Pour le processus de différenciation, le milieu William's complet additionné de 1,8% de DMSO (Dyméthylsulfoxyde, Sigma) a été utilisé pendant 2 semaines puis pour l'entretien des cellules (495).

Les HepaRG-ST-HBc ont été générées par une double transduction par des lentivirus, l'un codant pour le répresseur TetR et le gène de résistance à la blasticidine dans une cassette d'expression, l'autre le transgène d'intérêt (StrepTag-HBc codant la protéine Core d'HBV avec une étiquette à l'extrémité N terminale) avec un promoteur inducible à la tétracycline (tet/OMV) et un gène de résistance à la zéocine. Les HepaRG-TR-ST-HBc ont été maintenues dans le milieu William's complet (identique à celui des HepaRG) avec 100µg/mL de zéocine et 10µg/mL de blasticidine. La tétracycline a été ajoutée dans le milieu (1µg/mL) pour induire l'expression du transgène ST-HBc.

Les cellules HepG2 exprimant le récepteur NTCP (HepG2-NTCP) (496) de façon constitutive ont été maintenues en milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM, Life Technologies) dans lequel a été ajouté 5% de sérum de veau fœtal (Fetal Bovin Serum, Perbio), 1% de pénicilline/streptomycine (500U/mL Invitrogen), 1% de glutamine (GlutaMAX, Invitrogen), 1% de Pyruvate de Sodium (100mM Invitrogen) additionné de 5µg/mL de puromycine. Pour le processus de différenciation, les HepG2-NTCP ont étéensemencées à une densité de  $1^E5$  cellules par  $cm^2$ , puis dès confluence, le milieu a été renouvelé avec du DMEM complet additionné de 2,5% de DMSO. Les cellules ont été infectées par HBV un jour après l'ajout du DMSO.

Les hépatocytes primaires des foies humains ont été obtenus à partir de résections hépatiques chirurgicales auprès de patients ayant donné leur consentement (résections fournies par le Pr. Rivoire, Centre Léon Bérard, Lyon), comme décrit précédemment (497). Les PHH isolés ont été maintenues dans un milieu William's (Life Technologies) dans lequel a été ajouté 5% de sérum de veau fœtal (Perbio), 1% de pénicilline /streptomycine (500U/mL, Invitrogen), 1% de glutamine (GlutaMAX, Invitrogen), 2,5mg/L d'hydrocortisone Upjohn (Laboratoires Serb), 5mg/L d'insuline (Sigma Aldrich).

### **Virus et infection**

L'inoculum d'HBV a été préparé à partir de HepG2.2.15 stablement transfectées par le génome d'HBV (clone 2.2.15) (498), maintenues en milieu DMEM (Life Technologies) additionné de 2% de sérum fœtal de veau (Life Technologies), de 50 U/mL de pénicilline/streptomycine (Invitrogen), de 2 mM de GlutaMax (Invitrogen), de 110 µg/ml de Pyruvate de Sodium (Invitrogen), d'acides aminés non essentiels (Gibco) et de 2% de DMSO (Sigma).

Les particules HDV ont été produites à partir de Huh7 cotransfectées par un plasmide contenant le trimère du d'HDV (génotype 1) (pSVLD3) et un plasmide exprimant l'ORF PreS1/S2/S d'HBV (pT7HB2.7) (499). Les cellules ont été maintenues avec du milieu William's (Life Technologies) additionné de 10% de sérum de veau fœtal (Life Technologies), de 50 U/mL de pénicilline/streptomycine (Invitrogen), et de 2 mM de GlutaMax (Invitrogen).

Les surnageants de culture ont été collectés, clarifiés par centrifugation à 3500g, filtrés (0,22µM) et précipités sur la nuit à 4°C avec du PEG 8000 8% (Sigma). Les particules virales ont été centrifugées à 4500g pendant 1h, puis les culots de particules ont été resuspendus dans du milieu William's et conservés à -80°C. Les inocula ont été testés pour l'absence d'endotoxine (test Lonza). La titration virale a été réalisée par qPCR/qRT-PCR comme écrit plus loin.

Les virus HBV (génotype D sauf mention dans la légende des figures) ou HDV (Génotype 1) ont été inoculés avec le milieu correspondant au type d'hépatocytes utilisés (HepaRG, HepG2-NTCP ou PHH) additionné de 4% de PEG 8000 (Polyethylene

glycol), durant 16h. La multiplicité d'infection (MOI exprimée en nombre de génomes viraux par cellule ou vge/cell) est indiquée dans la légende des figures.

### **Purification StrepTag**

Les noyaux des hépatocytes ont été extraits grâce au kit NE-PER (nuclear and cytoplasmic extraction reagents, Thermo Scientific) selon les recommandations du fabricant. Les extraits nucléaires ont été traités ou non à la benzonase (Thermo Scientific) pendant 40 min à 4°C en mélangeant toutes les 10 min. Le système Strep-Tag® (IBA) a été utilisé pour purifier les complexes associées à la protéine Strep-Tag-HBc sur des colonnes de Strep-Tactin® (IBA), des résines de haute affinité pour le StrepTag, selon le protocole recommandé par le fabricant (500). La purification a aussi été réalisée avec des billes Strep-Tactin® (MagStrep type3 XT beads, IBA) (Figure 30B).

Les extraits purifiés ont été chargés sur des gels précoulés de SDS polyacrylamide en gradient de 4 à 15% (BioRad) pour réaliser un Western blot comme décrit plus bas, ou une coloration au nitrate d'Argent (Pierce Silver Stain kit, Thermo Scientific) comme recommandé par le fabricant.

### **Spectrométrie de masse (LC-MS/MS)**

Les extraits purifiés ont été préparés et digérés par la trypsine comme décrit précédemment (501). Les peptides obtenus ont été resuspendus par une solution d'acétonitrile 5% et d'acide trifluoroactique 0,1% puis analysés par nano-LC-MS/MS (UltiMate 3000, Dionex, and LTQ-Orbitrap Velos Pro, Thermo Scientific) comme décrit précédemment (501). Les pics d'intensités obtenus ont été analysés grâce aux logiciels MaxQuant (v1.5.3.30) et ProStaR. (Analyses effectuées Y. COUTE et L. BELMUNDES, CEA Grenoble).

### **Analyses bioinformatiques**

Les analyses bioinformatiques ont été réalisées par Y. KIM et C. COMBET, (U1052 CRCL Lyon), à partir des bases de données GeneOntology, PubMed, Uniprot, PANTHER V11.1, DAVIDv6.8, InstAct ; et du logiciel Cytoscape V3 .5.1

(NetworkAnalyser V2.7, PSICQUIC Web Service Client, BinGO V3.0.3, ClueGO V2.3.3).

### **Immunoprécipitation**

Pour les immunoprécipitations de la figure 31A à D, les cellules ont été lysées avec un tampon NP40 (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.5% Deoxycholate, 0.5% NP40, pH=8) avec de l'orthovanadate et du PMSF (fluorure de phénylméthylsulfonyl). En parallèle, les billes magnétiques (Bio-Adembeads G, Ademtech) ont été lavées, incubées avec 2 µg d'anticorps (anti-IgG2b isotype contrôle Thermo Scientific MA5-14447; anti-HBc Thermo Scientific MA1-7607) pendant 30 min sous agitation à température ambiante (TA). Après plusieurs étapes de lavages, les anticorps ont été liés de façon covalente aux billes grâce au réactif BS3 (2,5mM final, Thermo Scientific) incubé 30 min à température ambiante. BS3 a ensuite été inactivé par une solution de Tris pH=7,5 pendant 15 min à TA. Après plusieurs lavages, les billes ont été incubées avec le lysat cellulaire sur la nuit à 4°C sous agitation. Après plusieurs lavages, les extraits immunoprécipités par l'anticorps ont été élués pendant 2 min par une solution acide (50 mM glycine, 0.65% Tween 20, pH=2.7), puis le pH a été neutralisé par une solution de Tris-HCl pH=8,5 (1/10<sup>e</sup> du volume d'élution).

Pour l'immunoprécipitation de la figure 31E, les extraits nucléaires, préparés en utilisant le protocole du kit NE-PER (nuclear and cytoplasmic extraction reagents, Thermo Scientific) ont été incubés avec 5 µg d'anticorps anti-HBc (Thermo Scientific MA1-7607) toute la nuit à 4°C. Le lendemain 30 µL de billes (Dynabeads Protein G, Thermo Scientific) ont été lavées puis incubées avec le mélange anticorps-extraits pendant 50min à 4°C. Après plusieurs lavages, les extraits immunoprécipité par l'anticorps ont été élués par une solution de glycine acide (0,2M pH=2,5) pendant 1 min, puis le pH a été neutralisé par une solution de Tris-HCl 1M pH=10 (1/10<sup>e</sup> du volume d'élution).

### **Essai en double hybride de levure**

Service sous traité à la société Creative Biolabs.



## Western blot

Les cellules ont été collectées, lavées au PBS 1X et lysées dans un tampon RIPA (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholate, and 0.5% SDS) en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche) et d'inhibiteurs de phosphatase (Orthovanadate et PMSF, Sigma). Les protéines sont ensuite chargées sur des gels pré-coulés de SDS poly-acrylamide en gradient de 4 à 15% (BioRad) puis ont été transférées sur des membranes de nitrocellulose grâce au système de transfert Trans-blot Turbo (BioRad). Après saturation avec 5% de BSA dans du TBS-T (TBS, 0,1% Tween), les membranes ont été incubées sur la nuit 4°C avec l'anticorps primaire approprié dilué au 1/1000<sup>e</sup> dans la solution de saturation (liste des anticorps utilisés listés dans le tableau 3). Après plusieurs lavages au TBS-T, les protéines sont révélées par chemiluminescence (Clarity Western ECL Substrate, BioRad) en utilisant un anticorps secondaire anti-souris ou anti-lapin (Sigma) couplé à la peroxydase (1/10000). L'anticorps primaire anti-HBc Abcam a été utilisé dans l'expérience de la figure 31 (panels A, B, C, D), et le Dako pour les autres.

Anticorps (anti-)	Référence	Espèce
DDX17	Proteintech 19910-1-AP	lapin
DNAJB6	Abcam 198995	lapin
FUS	Santa cruz 47711	souris
HBc	Dako B0586	lapin
HBc	Abcam 140243	lapin
NONO	Santa cruz 67016	lapin
NTCP	Abcam 131084	lapin
PARP1	Abcam 6079	lapin
RBM14	Abcam 70636	lapin
RBMX	Abcam 190352	lapin
SRSF1	Abcam 38019	lapin
SRSF2/SC35	Abcam 204916	lapin
SRSF10	Abcam 77209	souris
TRA2 $\beta$	Abcam 171082	lapin
Tubuline	Abcam 6046	lapin

**Tableau 3. Liste anticorps primaires utilisés en Western blot**

## Immunofluorescence

Les cellules ont été fixées avec une solution de PFA (paraformaldéhyde) à 4% pendant 10 min à température ambiante puis lavées plusieurs fois, puis perméabilisées avec une solution de PBS à 0,5% de Triton 100X pendant 5 min à TA, puis saturées par une solution PBS/ 4% BSA (Euromedex)/ 0,2% Txen20 pendant 30 min à TA. Les anticorps primaires (listés dans le tableau 4) ont été dilués au 1/500<sup>e</sup> dans la solution de saturation et incubés sur les cellules 1h à TA. Après plusieurs lavages au PBS/ 1% BSA/ 0,2% Tween 20, les cellules ont été incubées avec un anticorps secondaire couplé à Alexa Fluor-488 ou à l'Alexa Fluor-555 (Invitrogen) dilué au 1/2000. Après plusieurs lavages, les noyaux ont été marqués au Hoescht. Les images ont été acquises au microscope confocal (Zeiss780).

Anticorps (anti-)	Référence	Espèce	Figures
FUS	Santa cruz 47711	souris	34
HBc	Abcam 140243	lapin	Co-marquage souris
HBc	Thermo MA1-7607	souris	Co-marquage lapin
hnRNPK	Santa cruz 28380	souris	34
NONO	Abcam 70335	lapin	34
RBMX	Abcam 190352	lapin	41
SFPQ	Abcam 11825	mouse	34
SRSF2/SC35	Abcam 11826	lapin	33
SRSF10	Atlas Ab HPA053831	lapin	40
TRA2 $\beta$	Abcam 171082	lapin	42

Tableau 4. Liste anticorps primaires utilisés pour en immunofluorescence

## Drogues

Le composé 1C8/JAD1 a été fourni par les Dr David Grierson (Université de Colombie Britannique) et Benoît Chabot (Université de Sherbrooke, Canada) et utilisée à 10 $\mu$ M. Le peptide PreS1 (aa sequence 2 to 48 of HBV PreS1, TNLSVPN PLGFFPDHQLDPAFRANSNPDWDFNPNKDHWPANKVG modified with a myristoyl moiety at N-terminus and resuspended in standard hydrochloride) qui a été utilisé comme inhibiteur d'entrée d'HBV ou d'HDV, a été synthétisé par Genscript

(Honk-Hong), et a été utilisé à 100nM. Les analogues de nucléosides (Tenofovir et Lamivudine) ont été fournis par Gilead Sciences et utilisés à 10 $\mu$ M. L'inhibiteur de l'activité de PARP1, BMN673, a été ajouté aux cellules à une concentration de 20nM. L'Interferon  $\alpha$  a été utilisé à 1000 UI/mL (Roche). Les schémas expérimentaux de l'usage de ces molécules sont décrits dans la légende des figures.

### Transfection cellulaires

Les cellules dHepaRG ou des PHH ont été transfectées avec le siRNA cibles détaillés dans le tableau 5, ou par des siRNA ne ciblant aucun ARN (Non targeting siRNA #1, Dharmacon). 24h avant et durant la transfection, les cellules dHepaRG ou les PHH ont été incubées avec leur milieu William's complet correspondant sans la penicilline/streptomycine. Pour les dHepaRG, les transfections ont été réalisées à l'aide du DharmaFECT I (Dharmacon) selon les recommandations du fabricant, avec une concentration finale en siRNA de 25nM dans le milieu de culture. De même pour les PHH, les transfections ont été réalisées avec la lipofectamine (Life Technologies). Après 16h d'incubation, les cellules ont été lavées une fois au PBS et le milieu renouvelé.

Gène	Référence (Dharmacon)
SRSF1	L-018672
FUS	L-009417
RBM14	L-010244
NONO	L-007756
SRSF10	L-190401
RBMX	L-011691
TRA2 $\beta$	L-007278

Tableau 5. Liste des siRNA cibles leur référence

### Tests de toxicité

La viabilité cellulaire a été analysée par le test au RN (rouge neutre). Les cellules ont été incubées pendant 2h à 37°C avec une solution à 40 $\mu$ g/mL de rouge neutre (Sigma) dissout dans le milieu William's complet (solution préparée la veille et

incubée à 37°C sur la nuit). Le milieu additionné du rouge neutre a été retiré, 4 lavages au PBS 1X ont été réalisés puis la solution de décoloration (50% éthanol, 49% d'eau distillée, 1% d'acide acétique glacial) a été ajoutée et incubée 10min sous agitation à TA (température ambiante) avec les cellules. 150µL de solution de décoloration de chaque échantillon ont été prélevés pour la mesure de la DO (densité optique) à 540nm. La DO mesurée pour chaque condition a été rapportée au contrôle fixé à 100, après soustraction de la valeur du blanc (solution de décoloration seule).

La densité cellulaire a été analysée par le test à la SRB (Sulforhodamine B). Les cellules fixées lors du test au RN préalable et sèches ont été incubées 30 min à TA avec une solution de 0,057% (masse/volume) de poudre SRB, 1% d'acide acétique qsp 100% d'eau distillée. 4 lavages ont été réalisés avec une solution à 1% d'acide acétique dilué dans l'eau distillée puis les cellules ont été incubées à TA jusqu'à séchage complet. La solution de décoloration (TrisBase 10mM pH10,5) a été incubée 5 minutes sous agitation à TA avec les cellules. 150µL de solution de décoloration de chaque échantillon ont été prélevés pour la mesure de la DO à 510nm. La DO pour chaque condition a été rapportée au contrôle fixé à 100, après soustraction de la valeur du blanc (solution de décoloration seule).

La cytotoxicité a été mesurée dans la partie III des résultats grâce au test de viabilité « Cell Titer Glo® Luminescent Cell Viability Assay » (Promega) selon les instructions du fabricant.

### **Analyse des paramètres viraux**

Dans le surnageant des cultures cellulaires, les antigènes viraux HBe et HBs ont été quantifiés par ELISA, par un kit de dosage immunologique par chimio-luminescence (Autobio, Chine) en suivant les instructions du fabricant.

L'ADN viral extracellulaire a été extrait des surnageants de cultures cellulaires à l'aide du kit Nucleospin Virus (Macherey Nagel) selon les instructions du fabricant, puis traitées avec de la RNase-A (Roche). Les ADN ou ARN viraux intracellulaires ont été extraits des cellules infectées à l'aide des kits Nucleospin tissue ou Nucleospin RNA respectivement (Macherey Nagel), selon les recommandations du fournisseur. Les ARN ont été retro transcrits en ADNc à l'aide du kit SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen).

La quantification des ADN et des ADNc d'HBV obtenus à partir des ARN HBV a été réalisée par qPCR à l'aide du LightCycler480 (Roche) et normalisés par le gène de ménage PRP. Les couples d'amorces sont listés dans le tableau 6. Une gamme standard a été utilisée pour la quantification des ADN extracellulaires. Pour tous les mélanges de réaction qPCR conventionnelle, 5µL de « SYBR Green I Master Light Cycler 480 » (Roche) ont été utilisés dans un volume final de 10 µL avec une concentration finale de 500nM pour chaque coupe d'amorce sens (F) et anti-sens (R) puis 4µL contenant de l'ADN ou de l'ADNc ont été ajoutés. Toutes les qPCR et les analyses ont été effectuées avec un appareil LightCycler 480 (Roche) et le logiciel associé.

Gène	Amorces
HBV (ADN)	F : GGAGGGATACATAGAGGTTTCCTTGA R : GTTGCCCGTTTGTCTCTAATTC
HBV (ARN)	F : ACCGAATGTTGCCCAAGGTC R : TATGCCTCAAGGTCGGTCGT
PRP (ADN)	F : CCTCACGAGATTGTGGGGAC R : GGCTCTTTTAGGTGGGGGTC
PRP (ARN)	F : ACCGAGGCAGAGCAGT R : CCCAGTGTTCCATCCTCC

**Tableau 6. Couples d'amorces pour la (RT)-qPCR conventionnelle**

Pour la quantification de l'ADNccc, l'ADN total a été digéré par la T5 exonuclease (20U par réaction ; NEB) pendant 30 min à 37° ensuite inactivée par une incubation de 30 min à 70°C. Les ADN digérés ou l'ARNpg (reverse transcrit) ont été soumis à une (RT)-qPCR à l'aide du mélange TaqMan Fast Advanced Master Mix (Life Technologies), de sondes et d'un couple d'amorces (Tableau 7). Les niveaux d'ARNpg ont été normalisés par GUS-B (#Hs99999908\_m1), et ceux de l'ADNccc par la β-globine (#Hs00758889\_s1) à l'aide d'un mélange de deux sondes et un couple d'amorces commercial (Life Technologies).

Pour les réactions de qPCR TaqMan, 5µL de « TaqMan Fast Advanced Master Mix » (Life Technologies) ont été utilisés dans un volume final de 10 µL avec une concentration finale de 500nM pour chaque coupe d'amorce sens (F) et anti-sens (R),

et avec une concentration finale de 200nM de sonde TaqMan. Puis 4µL contenant de l'ADN ou de l'ADNc ont été ajoutés. Toutes les qPCR et les analyses ont été effectuées avec un appareil StepOnePlus (Applied Biosystems) et le logiciel associé.

La quantification de l'ARN HDV a été réalisée par une RT-qPCR en une étape (Express One-Step SYBR Greener, Life Technologies) grâce au protocole décrit précédemment (502) et en utilisant l'appareil LightCycler 480 (Roche).

Cible TaqMan	Amorces & Sondes
ADNccc	Sens : CCGTGTGCACTTCGCTTCA Antisens : GCACAGCTTGGAGGCTTGA Sonde : [6FAM]CATGGAGACCACCGTGAACGCCC[BHQ1]
ARNpg	Antisens : GGAGTGTGGATTGCGACTCCT Sens : AGATTGAGATCTTCTGCGAC Sonde : [6FAM]AGGCAGGTCCCCTAGAAGAAGAACTCC[BHQ1]

**Tableau 7. Couples d'amorces pour la (RT)-qPCR TaqMan**

### AS-PCR et RT-qPCR des transcrits d'HBV

Ces analyses ont été réalisées par la plateforme RNomics de l'Université de Sherbrooke. Pour les transcrits d'HBV, les paires d'amorces ont été créées à partir de la séquence complète du génome d'HBV puis validées pour la qPCR comme décrit précédemment (503,504). Après validation de leur intégrité (station Agilent LabChip), 200ng d'ARN (quantifiés au Nanodrop Thermo Scientific) ont été reverse transcrits (Transcriptor Reverse transcriptase, Sigma). 10ng d'ADNc ont été utilisés pour la quantification des transcrits en présence de leur paire d'amorces spécifique (Tableaux 8 et 9) grâce à l'appareil ABI 7500 (Applied Biosystems). Les valeurs obtenues ont été normalisées par des gènes de ménage (MLRP19, PUM1 et YWHAZ). Les produits de qPCR après amplification par les couples d'amorces « Ase » ont été soumis à une analyse par électrophorèse capillaire (Perkin Elmer LabChip GX Touch HT capillary electrophoresis system) qui permet de quantifier chaque taille de fragment et d'exprimer la forme la plus longue sur la somme de toutes les formes de la région amplifiée (479).

## Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées par le test non paramétrique Mann-Whitney grâce au logiciel GraphPad Prism 6.0, avec les significativités suivantes : \*  $p < 0,05$

\*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Nom de l'amorce sens	Nom de l'amorce anti-sens	Amorce sens	Amorce anti-sens
HBV.D.sv7.sv9.q.F1	HBV.D.sv1.sv2.sv4.q.R1	TGCCCTATCCTATCAACACTTCCG	GCTGGTGGTTGAGGATCATTGAGG
HBV.D.sv2.sv8.sv10.q.F1	HBV.D.sv1.sv2.sv4.q.R1	TCAGACGACGAGGCAGGTCC	GCTGGTGGTTGAGGATCATTGAGG
HBV.D.sv3.q.F3	HBV.D.sv3.q.R3	CATACTGCACTCAGGATCCTCAACC	GTCCGAAGGTTTGGTACAGCAACA
HBV.D.sv4.q.F3	HBV.D.sv1.sv2.sv4.q.R1	GCAATTCTTTACGACGAGGCAGGT	GCTGGTGGTTGAGGATCATTGAGG
HBV.D.sv5.q.F2	HBV.D.sv5.q.R2	TTCTTTGATCCTCAACCACCAGCAC	GGTGCAATTTCCGTCGGAAGGT
HBV.D.sv6.q.F2	HBV.D.sv6.q.R2	GCCTCGCAGACGAAGGTCTC	GGTGGTTGAGGATCCTTATGAGTCCA
HBV.D.sv7.q.F6	HBV.D.sv7.q.R6	ACCAAATGCCCTATCCTATCAACAC	CTGGTGGTTGAGGATCCTTGTGG
HBV.D.sv2.sv8.sv10.q.F2	HBV.D.sv7.sv8.q.R2	GCACTCAGACGACGAGGCAG	TGGATCCAAATTGAGGTTCCCGAGAT
HBV.D.sv9.q.F4	HBV.D.sv9.q.R4	AGTTCAGGCAACTCTTGTGGTTTCA	CGGTAGTTCCCCATTGAGGTTCC
HBV.D.sv2.sv8.sv10.q.F2	HBV.D.sv10.q.R2	GCACTCAGACGACGAGGCAG	TCCCCATTGAGGTTCCCGAGAT
HBV.D.sv11.q.F2	HBV.D.sv11.q.R2	GGACTCATAAGGGGGAACCTACCGT	AACGCCGACACACATCCAG
HBV.D.sv12.q.F1	HBV.D.sv12.q.R1	ACCATACTGCACTCAGAGAAACCG	AGGATAGGGGCATTTGGTGGTCT
HBV.D.sv13.q.F2	HBV.D.sv13.q.R2	GGAACCTCAATTTGGATCCAGCCTTC	AAACCCAGCCCCGAATGCTCC
HBV.D.sv14.q.F2	HBV.D.sv14.q.R2	CAAGGTGAGTCTGGAGCAAACA	GTTGGCAGCACAGCCTAGCA
HBV.D.sv15.q.F7	HBV.D.sv15.q.R7	TGGATGTGTCTGCGGCGTTTTA	TTGGCAGCACAGCACCTTATGATAG
HBV.D.intron1.q.F1	HBV.D.intron1.q.R1	TCTAGCTACCTGGGTGGGTGT	AGAATAAAGACCAGTAAAGTTCCCCA
HBV.D.intron2.q.F1	HBV.D.sv13.q.R1	TCCACCAGCAATCCTCTGGGA	CAGCCCGAATGCTCCAGCTC
HBV.D.intron2b.q.F1	HBV.D.intron2b.q.R1	AGCGCCTCATTTTGTGGGTCA	TGGTGGTTCGGGAAAGAATCCCCA
MRPL19_G_3_f	MRPL19_G_3_r	AAGGAGAAAAGTACTCCACATTCCAGAG	TGGGTCAGCTGTAGTAACACGA
PUM1_global_for_1	PUM1_global_rev_1	TGAGGTGTGCACCATGAAC	CAGAAATGTGCTTGCCATAGG
YWHAZ_G_f	YWHAZ_G_r	TCCCCAATGCTTACAAGCAGA	TCTTGTGCATCACCAGCGCAA

**Tableau 8. Couples d'amorces pour la RT-qPCR des transcrits épissés ou non d'HBV**

Name	Nom des amorces		Séquences des amorces	
	Sens	Anti-sens	Sens	Anti-sens
ase1	HBV.D.sv4.sv5.q.F1	HBV.D.ase1.R1	CGCCTCAGCTCTGTATCGGGA	TGCGAGGCGAGGGAGTTCTT
ase2	HBV.D.sv6.sv11.q.F1	HBV.D.ase2.R1	AAGAACTCCCTCGCCTCGCA	GTCCCGTGCTGGTGGTTGAG
ase2b	HBV.D.ase2b.F1	HBV.D.ase2b.R1	GAAGGTCTCAATCGCCGCGT	TGGAGGTTGGGGACTGCGAA
ase3	HBV.D.sv14.sv15.q.F1	HBV.D.ase3.R1	CTGGATGTGTCTGCGGCGTT	TCCGAACGGCAGACGGAGAA

**Tableau 9. Couples d'amorces pour l'AS-PCR des transcrits d'HBV**

# REFERENCES

1. Flint J, Racaniello VR, Rall GF, Skalka AM. Principles of Virology, Fourth Edition, Bundle [Internet]. American Society of Microbiology; 2015 [cited 2018 Jul 16]. Available from: <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555819521>
2. Yan N, Chen ZJ. Intrinsic Antiviral Immunity. *Nat Immunol*. 2012 Feb 16;13(3):214–22.
3. Maillard PV, Ciaudo C, Marchais A, Li Y, Jay F, Ding SW, et al. Antiviral RNA Interference in Mammalian Cells. *Science* [Internet]. 2013 Oct 11 [cited 2018 Jul 17];342(6155). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3853215/>
4. Chen Y, Hu J, Cai X, Huang Y, Zhou X, Tu Z, et al. APOBEC3B edits HBV DNA and inhibits HBV replication during reverse transcription. *Antiviral Res*. 2018;149:16–25.
5. Harris RS, Bishop KN, Sheehy AM, Craig HM, Petersen-Mahrt SK, Watt IN, et al. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell*. 2003 Jun 13;113(6):803–9.
6. Stremlau M, Perron M, Lee M, Li Y, Song B, Javanbakht H, et al. Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5alpha restriction factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Apr 4;103(14):5514–9.
7. Neil SJD, Zang T, Bieniasz PD. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*. 2008 Jan 24;451(7177):425–30.
8. Lahouassa H, Daddacha W, Hofmann H, Ayinde D, Logue EC, Dragin L, et al. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat Immunol*. 2012 Feb 12;13(3):223–8.
9. Mammano F, Clavel F. Interactions VIH-cellules : partenaires et adversaires. *Virologie*. 2013 May 1;17(3):145–56.
10. Bieniasz PD. Intrinsic immunity: a front-line defense against viral attack. *Nat Immunol*. 2004 Nov;5(11):1109–15.
11. Lomonte P. Corps nucléaires PML, centromères et contrôle de la latence du virus herpès simplex 1. *Virologie*. 2014 May 1;18(3):170–9.
12. Everett RD, Chelbi-Alix MK. PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie*. 2007 Jul;89(6–7):819–30.
13. Hoppe A, Beech SJ, Dimmock J, Leppard KN. Interaction of the Adenovirus Type 5 E4 Orf3 Protein with Promyelocytic Leukemia Protein Isoform II Is Required for ND10 Disruption. *J Virol*. 2006 Mar 15;80(6):3042–9.



14. Smith S, Weller SK. HSV-I and the cellular DNA damage response. *Future Virol.* 2015 Apr;10(4):383–97.
15. Lanfranca MP, Mostafa HH, Davido DJ. HSV-1 ICP0: An E3 Ubiquitin Ligase That Counteracts Host Intrinsic and Innate Immunity. *Cells.* 2014 May 20;3(2):438–54.
16. Grzybowska EA. Human intronless genes: Functional groups, associated diseases, evolution, and mRNA processing in absence of splicing. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Jul 20;424(1):1–6.
17. Mandal D, Feng Z, Stoltzfus CM. Excessive RNA Splicing and Inhibition of HIV-1 Replication Induced by Modified U1 Small Nuclear RNAs. *J Virol.* 2010 Dec;84(24):12790–800.
18. Bond CS, Fox AH. Paraspeckles: nuclear bodies built on long noncoding RNA. *J Cell Biol.* 2009 Sep 7;186(5):637–44.
19. Nakagawa S, Hirose T. Paraspeckle nuclear bodies—useful uselessness? *Cell Mol Life Sci.* 2012 Sep 1;69(18):3027–36.
20. Krietsch J, Caron M-C, Gagné J-P, Ethier C, Vignard J, Vincent M, et al. PARP activation regulates the RNA-binding protein NONO in the DNA damage response to DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* 2012 Nov 1;40(20):10287–301.
21. Dreyfuss G, Swanson MS, Piñol-Roma S. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles and the pathway of mRNA formation. *Trends Biochem Sci.* 1988 Mar 1;13(3):86–91.
22. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science.* 2001 Feb 16;291(5507):1304–51.
23. Oubridge C, Ito N, Evans PR, Teo CH, Nagai K. Crystal structure at 1.92 Å resolution of the RNA-binding domain of the U1A spliceosomal protein complexed with an RNA hairpin. *Nature.* 1994 Dec 1;372(6505):432–8.
24. Dominguez C, Fiset J-F, Chabot B, Allain FH-T. Structural basis of G-tract recognition and encaging by hnRNP F quasi-RRMs. *Nat Struct Mol Biol.* 2010 Jul;17(7):853–61.
25. Hofmann Y, Wirth B. hnRNP-G promotes exon 7 inclusion of survival motor neuron (SMN) via direct interaction with Htra2-beta1. *Hum Mol Genet.* 2002 Aug 15;11(17):2037–49.
26. Young PJ, DiDonato CJ, Hu D, Kothary R, Androphy EJ, Lorson CL. SRp30c-dependent stimulation of survival motor neuron (SMN) exon 7 inclusion is facilitated by a direct interaction with hTra2 beta 1. *Hum Mol Genet.* 2002 Mar 1;11(5):577–87.
27. Hall TMT. Multiple modes of RNA recognition by zinc finger proteins. *Curr Opin Struct Biol.* 2005 Jun;15(3):367–73.

28. Hudson BP, Martinez-Yamout MA, Dyson HJ, Wright PE. Recognition of the mRNA AU-rich element by the zinc finger domain of TIS11d. *Nat Struct Mol Biol.* 2004 Mar;11(3):257–64.
29. Gorelick RJ, Gagliardi TD, Bosche WJ, Wiltrout TA, Coren LV, Chabot DJ, et al. Strict Conservation of the Retroviral Nucleocapsid Protein Zinc Finger Is Strongly Influenced by Its Role in Viral Infection Processes: Characterization of HIV-1 Particles Containing Mutant Nucleocapsid Zinc-Coordinating Sequences. *Virology.* 1999 Mar 30;256(1):92–104.
30. Backe PH, Messias AC, Ravelli RBG, Sattler M, Cusack S. X-ray crystallographic and NMR studies of the third KH domain of hnRNP K in complex with single-stranded nucleic acids. *Struct Lond Engl* 1993. 2005 Jul;13(7):1055–67.
31. Grishin NV. KH domain: one motif, two folds. *Nucleic Acids Res.* 2001 Feb 1;29(3):638–43.
32. Cléry A, Allain FH-T. FROM STRUCTURE TO FUNCTION OF RNA BINDING DOMAINS [Internet]. Landes Bioscience; 2013 [cited 2018 Jul 8]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK63528/>
33. Rytter JM, Schultz SC. Molecular basis of double-stranded RNA-protein interactions: structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA. *EMBO J.* 1998 Dec 15;17(24):7505–13.
34. Gerstberger S, Hafner M, Tuschl T. A census of human RNA-binding proteins. *Nat Rev Genet.* 2014;15(12):829–45.
35. Krainer AR, Maniatis T. Multiple factors including the small nuclear ribonucleoproteins U1 and U2 are necessary for pre-mRNA splicing in vitro. *Cell.* 1985 Oct;42(3):725–36.
36. Krainer AR, Conway GC, Kozak D. The essential pre-mRNA splicing factor SF2 influences 5' splice site selection by activating proximal sites. *Cell.* 1990 Jul 13;62(1):35–42.
37. Fu XD, Mayeda A, Maniatis T, Krainer AR. General splicing factors SF2 and SC35 have equivalent activities in vitro, and both affect alternative 5' and 3' splice site selection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Dec 1;89(23):11224–8.
38. Manley JL, Krainer AR. A rational nomenclature for serine/arginine-rich protein splicing factors (SR proteins). *Genes Dev.* 2010 Jun 1;24(11):1073–4.
39. Huang Y, Steitz JA. SRprises along a Messenger's Journey. *Mol Cell.* 2005 Mar 4;17(5):613–5.
40. Tacke R, Tohyama M, Ogawa S, Manley JL. Human Tra2 proteins are sequence-specific activators of pre-mRNA splicing. *Cell.* 1998 Apr 3;93(1):139–48.

41. Twyffels L, Gueydan C, Krays V. Shuttling SR proteins: more than splicing factors. *FEBS J.* 2011 Sep;278(18):3246–55.
42. Long JC, Caceres JF. The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochem J.* 2009 Jan 1;417(1):15–27.
43. Beyer AL, Christensen ME, Walker BW, LeSturgeon WM. Identification and characterization of the packaging proteins of core 40S hnRNP particles. *Cell.* 1977 May;11(1):127–38.
44. Dreyfuss G, Matunis MJ, Piñol-Roma S, Burd CG. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem.* 1993;62:289–321.
45. Habelhah H, Shah K, Huang L, Ostareck-Lederer A, Burlingame AL, Shokat KM, et al. ERK phosphorylation drives cytoplasmic accumulation of hnRNP-K and inhibition of mRNA translation. *Nat Cell Biol.* 2001 Mar;3(3):325–30.
46. Kiledjian M, Dreyfuss G. Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *EMBO J.* 1992 Jul;11(7):2655–64.
47. Corley SM, Gready JE. Identification of the RGG Box Motif in Shadoo: RNA-Binding and Signaling Roles? *Bioinforma Biol Insights.* 2008 Nov 19;2:383–400.
48. Cartegni L, Maconi M, Morandi E, Cobianchi F, Riva S, Biamonti G. hnRNP A1 selectively interacts through its Gly-rich domain with different RNA-binding proteins. *J Mol Biol.* 1996 Jun 14;259(3):337–48.
49. Soulard M, Della Valle V, Siomi MC, Piñol-Roma S, Codogno P, Bauvy C, et al. hnRNP G: sequence and characterization of a glycosylated RNA-binding protein. *Nucleic Acids Res.* 1993 Sep 11;21(18):4210–7.
50. Elliott DJ. The role of potential splicing factors including RBMY, RBMX, hnRNPG-T and STAR proteins in spermatogenesis. *Int J Androl.* 2004 Dec;27(6):328–34.
51. Nasim MT, Chernova TK, Chowdhury HM, Yue B-G, Eperon IC. HnRNP G and Tra2 $\beta$ : opposite effects on splicing matched by antagonism in RNA binding. *Hum Mol Genet.* 2003 Jun 1;12(11):1337–48.
52. Martinez-Contreras R, Cloutier P, Shkreta L, Fiset J-F, Revil T, Chabot B. hnRNP proteins and splicing control. *Adv Exp Med Biol.* 2007;623:123–47.
53. Piñol-Roma S, Dreyfuss G. hnRNP proteins: localization and transport between the nucleus and the cytoplasm. *Trends Cell Biol.* 1993 May;3(5):151–5.
54. Yuryev A, Patturajan M, Litingtung Y, Joshi RV, Gentile C, Gebara M, et al. The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II interacts with a novel set of serine/arginine-rich proteins. *Proc Natl Acad Sci.* 1996 Jul 9;93(14):6975–80.
55. Egloff S, Murphy S. Cracking the RNA polymerase II CTD code. *Trends Genet TIG.* 2008 Jun;24(6):280–8.

56. Lemieux B, Blanchette M, Monette A, Mouland AJ, Wellinger RJ, Chabot B. A Function for the hnRNP A1/A2 Proteins in Transcription Elongation. *PLoS ONE* [Internet]. 2015 May 26 [cited 2018 Jul 30];10(5). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4444011/>
57. Lin S, Coutinho-Mansfield G, Wang D, Pandit S, Fu X-D. The splicing factor SC35 has an active role in transcriptional elongation. *Nat Struct Mol Biol*. 2008 Aug;15(8):819–26.
58. Schwartz JC, Ebmeier CC, Podell ER, Heimiller J, Taatjes DJ, Cech TR. FUS binds the CTD of RNA polymerase II and regulates its phosphorylation at Ser2. *Genes Dev*. 2012 Dec 15;26(24):2690–5.
59. Takemoto T, Nishio Y, Sekine O, Ikeuchi C, Nagai Y, Maeno Y, et al. RBMX is a novel hepatic transcriptional regulator of SREBP-1c gene response to high-fructose diet. *FEBS Lett*. 2007 Jan 23;581(2):218–22.
60. Shin K-H, Kim RH, Kim RH, Kang MK, Park N-H. hnRNP G elicits tumor suppressive activity in part by upregulating the expression of Txnip-. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Aug 8;372(4):880–5.
61. Kornblihtt AR. Coupling transcription and alternative splicing. *Adv Exp Med Biol*. 2007;623:175–89.
62. Nilsen TW, Graveley BR. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature*. 2010 Jan 28;463(7280):457–63.
63. Will CL, Lührmann R. Spliceosome Structure and Function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2011 Jul [cited 2018 Jul 30];3(7). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3119917/>
64. Reed R. Mechanisms of fidelity in pre-mRNA splicing. *Curr Opin Cell Biol*. 2000 Jun;12(3):340–5.
65. Roscigno RF, Garcia-Blanco MA. SR proteins escort the U4/U6.U5 tri-snRNP to the spliceosome. *RNA*. 1995 Jan 9;1(7):692–706.
66. Wang Y, Liu J, Huang BO, Xu Y-M, Li J, Huang L-F, et al. Mechanism of alternative splicing and its regulation. *Biomed Rep*. 2015 Mar;3(2):152–8.
67. Eldridge AG, Li Y, Sharp PA, Blencowe BJ. The SRm160/300 splicing coactivator is required for exon-enhancer function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 May 25;96(11):6125–30.
68. Ibrahim EC, Schaal TD, Hertel KJ, Reed R, Maniatis T. Serine/arginine-rich protein-dependent suppression of exon skipping by exonic splicing enhancers. *Proc Natl Acad Sci*. 2005 Apr 5;102(14):5002–7.
69. Graveley BR, Hertel KJ, Maniatis T. The role of U2AF35 and U2AF65 in enhancer-dependent splicing. *RNA*. 2001 Jan 6;7(6):806–18.

70. Zhu J, Mayeda A, Krainer AR. Exon identity established through differential antagonism between exonic splicing silencer-bound hnRNP A1 and enhancer-bound SR proteins. *Mol Cell*. 2001 Dec;8(6):1351–61.
71. Hanamura A, Cáceres JF, Mayeda A, Franza BR, Krainer AR. Regulated tissue-specific expression of antagonistic pre-mRNA splicing factors. *RNA*. 1998 Jan 4;4(4):430–44.
72. Graveley BR, Hertel KJ, Maniatis T. A systematic analysis of the factors that determine the strength of pre-mRNA splicing enhancers. *EMBO J*. 1998 Nov 16;17(22):6747–56.
73. Jacob AG, Smith CWJ. Intron retention as a component of regulated gene expression programs. *Hum Genet*. 2017;136(9):1043–57.
74. Bradley T, Cook ME, Blanchette M. SR proteins control a complex network of RNA-processing events. *RNA*. 2015 Jan;21(1):75–92.
75. Shin C, Manley JL. The SR protein SRp38 represses splicing in M phase cells. *Cell*. 2002 Nov 1;111(3):407–17.
76. Shin C, Feng Y, Manley JL. Dephosphorylated SRp38 acts as a splicing repressor in response to heat shock. *Nature*. 2004 Feb 5;427(6974):553–8.
77. Prasad J, Colwill K, Pawson T, Manley JL. The protein kinase Clk/Sty directly modulates SR protein activity: both hyper- and hypophosphorylation inhibit splicing. *Mol Cell Biol*. 1999 Oct;19(10):6991–7000.
78. Xiao SH, Manley JL. Phosphorylation of the ASF/SF2 RS domain affects both protein-protein and protein-RNA interactions and is necessary for splicing. *Genes Dev*. 1997 Feb 1;11(3):334–44.
79. Shi Y, Manley JL. A complex signaling pathway regulates SRp38 phosphorylation and pre-mRNA splicing in response to heat shock. *Mol Cell*. 2007 Oct 12;28(1):79–90.
80. Feng Y, Chen M, Manley JL. Phosphorylation switches the general splicing repressor SRp38 to a sequence-specific activator. *Nat Struct Mol Biol*. 2008 Oct;15(10):1040–8.
81. Shin C, Kleiman FE, Manley JL. Multiple Properties of the Splicing Repressor SRp38 Distinguish It from Typical SR Proteins. *Mol Cell Biol*. 2005 Sep;25(18):8334–43.
82. Zhou X, Wu W, Li H, Cheng Y, Wei N, Zong J, et al. Transcriptome analysis of alternative splicing events regulated by SRSF10 reveals position-dependent splicing modulation. *Nucleic Acids Res*. 2014 Apr;42(6):4019–30.
83. Li H, Cheng Y, Wu W, Liu Y, Wei N, Feng X, et al. SRSF10 regulates alternative splicing and is required for adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol*. 2014 Jun;34(12):2198–207.

84. Zhou X, Li X, Cheng Y, Wu W, Xie Z, Xi Q, et al. BCLAF1 and its splicing regulator SRSF10 regulate the tumorigenic potential of colon cancer cells. *Nat Commun.* 2014 Aug 5;5:4581.
85. Wei N, Cheng Y, Wang Z, Liu Y, Luo C, Liu L, et al. SRSF10 Plays a Role in Myoblast Differentiation and Glucose Production via Regulation of Alternative Splicing. *Cell Rep.* 2015 Nov 24;13(8):1647–57.
86. Elliott DJ, Best A, Dalgliesh C, Ehrmann I, Grellscheid S. How does Tra2 $\beta$  protein regulate tissue-specific RNA splicing? *Biochem Soc Trans.* 2012 Aug;40(4):784–8.
87. Park E, Han J, Son GH, Lee MS, Chung S, Park SH, et al. Cooperative Actions of Tra2 $\alpha$  with 9G8 and SRp30c in the RNA Splicing of the Gonadotropin-releasing Hormone Gene Transcript. *J Biol Chem.* 2006 Jun 1;281(1):401–9.
88. Tran Q, Coleman TP, Roesser JR. Human transformer 2beta and SRp55 interact with a calcitonin-specific splice enhancer. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Jan 27;1625(2):141–52.
89. Kondo S, Yamamoto N, Murakami T, Okumura M, Mayeda A, Imaizumi K. Tra2 beta, SF2/ASF and SRp30c modulate the function of an exonic splicing enhancer in exon 10 of tau pre-mRNA. *Genes Cells Devoted Mol Cell Mech.* 2004 Feb;9(2):121–30.
90. Pellizzoni L, Kataoka N, Charroux B, Dreyfuss G. A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing. *Cell.* 1998 Nov 25;95(5):615–24.
91. Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, Kröning A-K, Karle K, Monani UR, et al. Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J Cell Biol.* 2003 Nov 24;163(4):801–12.
92. Cartegni L, Krainer AR. Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat Genet.* 2002 Apr;30(4):377–84.
93. Cléry A, Jayne S, Benderska N, Dominguez C, Stamm S, Allain FH-T. Molecular basis of purine-rich RNA recognition by the human SR-like protein Tra2- $\beta$ 1. *Nat Struct Mol Biol.* 2011 Apr;18(4):443–50.
94. Moursy A, Allain FH-T, Cléry A. Characterization of the RNA recognition mode of hnRNP G extends its role in SMN2 splicing regulation. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jun 1;42(10):6659–72.
95. Li J, Hawkins IC, Harvey CD, Jennings JL, Link AJ, Patton JG. Regulation of alternative splicing by SRp86 and its interacting proteins. *Mol Cell Biol.* 2003 Nov;23(21):7437–47.

96. Cáceres JF, Sreaton GR, Krainer AR. A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev.* 1998 Jan 1;12(1):55–66.
97. Huang Y, Steitz JA. Splicing Factors SRp20 and 9G8 Promote the Nucleocytoplasmic Export of mRNA. *Mol Cell.* 2001 Apr;7(4):899–905.
98. Huang Y, Gattoni R, Stévenin J, Steitz JA. SR Splicing Factors Serve as Adapter Proteins for TAP-Dependent mRNA Export. *Mol Cell.* 2003 Mar;11(3):837–43.
99. Huang Y, Yario TA, Steitz JA. A molecular link between SR protein dephosphorylation and mRNA export. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jun 29;101(26):9666–70.
100. Piñol-Roma S, Dreyfuss G. Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature.* 1992 Feb 20;355(6362):730–2.
101. Miller JN, Pearce DA. Nonsense-mediated decay in genetic disease: friend or foe? *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2014 Dec;762:52–64.
102. Abernathy E, Glaunsinger B. Emerging roles for RNA degradation in viral replication and antiviral defense. *Virology.* 2015 May;479–480:600–8.
103. Zhang Z, Krainer AR. Involvement of SR proteins in mRNA surveillance. *Mol Cell.* 2004 Nov 19;16(4):597–607.
104. Sato H, Hosoda N, Maquat LE. Efficiency of the pioneer round of translation affects the cellular site of nonsense-mediated mRNA decay. *Mol Cell.* 2008 Feb 1;29(2):255–62.
105. Lareau LF, Inada M, Green RE, Wengrod JC, Brenner SE. Unproductive splicing of SR genes associated with highly conserved and ultraconserved DNA elements. *Nature.* 2007 Apr 19;446(7138):926–9.
106. Ni JZ, Grate L, Donohue JP, Preston C, Nobida N, O'Brien G, et al. Ultraconserved elements are associated with homeostatic control of splicing regulators by alternative splicing and nonsense-mediated decay. *Genes Dev.* 2007 Mar 15;21(6):708–18.
107. Grellscheid SN, Dalgliesh C, Rozanska A, Grellscheid D, Bourgeois CF, Stévenin J, et al. Molecular design of a splicing switch responsive to the RNA binding protein Tra2 $\beta$ . *Nucleic Acids Res.* 2011 Oct;39(18):8092–104.
108. Lemaire R, Prasad J, Kashima T, Gustafson J, Manley JL, Lafyatis R. Stability of a PKCI-1-related mRNA is controlled by the splicing factor ASF/SF2: a novel function for SR proteins. *Genes Dev.* 2002 Mar 1;16(5):594–607.
109. Loflin P, Chen C-YA, Shyu A-B. Unraveling a cytoplasmic role for hnRNP D in the in vivo mRNA destabilization directed by the AU-rich element. *Genes Dev.* 1999 Jul 15;13(14):1884–97.

110. Gratacós FM, Brewer G. The role of AUF1 in regulated mRNA decay. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2010;1(3):457–73.
111. Chaudhury A, Chander P, Howe PH. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) in cellular processes: Focus on hnRNP E1's multifunctional regulatory roles. *RNA*. 2010 Aug;16(8):1449–62.
112. Michlewski G, Sanford JR, Cáceres JF. The splicing factor SF2/ASF regulates translation initiation by enhancing phosphorylation of 4E-BP1. *Mol Cell*. 2008 Apr 25;30(2):179–89.
113. Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell*. 2005 Nov 18;123(4):569–80.
114. Swartz JE, Bor Y-C, Misawa Y, Rekosh D, Hammarskjöld M-L. The Shuttling SR Protein 9G8 Plays a Role in Translation of Unspliced mRNA Containing a Constitutive Transport Element. *J Biol Chem*. 2007 Jun 7;282(27):19844–53.
115. Bedard KM, Daijogo S, Semler BL. A nucleo-cytoplasmic SR protein functions in viral IRES-mediated translation initiation. *EMBO J*. 2007 Jan 24;26(2):459–67.
116. Kafasla P, Lin H, Curry S, Jackson RJ. Activation of picornaviral IRESs by PTB shows differential dependence on each PTB RNA-binding domain. *RNA*. 2011 Jun;17(6):1120–31.
117. Ostareck DH, Ostareck-Lederer A, Wilm M, Thiele BJ, Mann M, Hentze MW. mRNA Silencing in Erythroid Differentiation: hnRNP K and hnRNP E1 Regulate 15-Lipoxygenase Translation from the 3' End. *Cell*. 1997 May 16;89(4):597–606.
118. Wansink DG, Schul W, van der Kraan I, van Steensel B, van Driel R, de Jong L. Fluorescent labeling of nascent RNA reveals transcription by RNA polymerase II in domains scattered throughout the nucleus. *J Cell Biol*. 1993 Jul;122(2):283–93.
119. Mueller WF, Hertel KJ. The role of SR and SR-related proteins in pre-mRNA splicing. In: *RNA Binding Proteins*. Zdravko Lorkovic. Landes Bioscience; 2012.
120. Colwill K, Pawson T, Andrews B, Prasad J, Manley JL, Bell JC, et al. The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution. *EMBO J*. 1996 Jan 15;15(2):265–75.
121. Sacco-Bubulya P, Spector DL. Disassembly of interchromatin granule clusters alters the coordination of transcription and pre-mRNA splicing. *J Cell Biol*. 2002 Feb 4;156(3):425–36.
122. Trinkle-Mulcahy L, Sleeman JE, Lamond AI. Dynamic targeting of protein phosphatase 1 within the nuclei of living mammalian cells. *J Cell Sci*. 2001 Dec;114(Pt 23):4219–28.



123. Bernard D, Prasanth KV, Tripathi V, Colasse S, Nakamura T, Xuan Z, et al. A long nuclear-retained non-coding RNA regulates synaptogenesis by modulating gene expression. *EMBO J*. 2010 Sep 15;29(18):3082–93.
124. Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, Song DY, Pan Q, Watt AT, et al. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol Cell*. 2010 Sep 24;39(6):925–38.
125. Nakagawa S, Ip JY, Shioi G, Tripathi V, Zong X, Hirose T, et al. Malat1 is not an essential component of nuclear speckles in mice. *RNA N Y N*. 2012 Aug;18(8):1487–99.
126. Fox AH, Lam YW, Leung AKL, Lyon CE, Andersen J, Mann M, et al. Paraspeckles: a novel nuclear domain. *Curr Biol CB*. 2002 Jan 8;12(1):13–25.
127. Hennig S, Kong G, Mannen T, Sadowska A, Kobelke S, Blythe A, et al. Prion-like domains in RNA binding proteins are essential for building subnuclear paraspeckles. *J Cell Biol*. 2015 Aug 17;210(4):529–39.
128. Zheng D, Chen C-YA, Shyu A-B. Unraveling regulation and new components of human P-bodies through a protein interaction framework and experimental validation. *RNA*. 2011 Sep;17(9):1619–34.
129. Mahboubi H, Stochaj U. Cytoplasmic stress granules: Dynamic modulators of cell signaling and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2017 Apr;1863(4):884–95.
130. Delestienne N, Wauquier C, Soin R, Dierick J-F, Gueydan C, Krays V. The splicing factor ASF/SF2 is associated with TIA-1-related/TIA-1-containing ribonucleoproteic complexes and contributes to post-transcriptional repression of gene expression. *FEBS J*. 2010 Jun;277(11):2496–514.
131. Guil S, Long JC, Cáceres JF. hnRNP A1 relocalization to the stress granules reflects a role in the stress response. *Mol Cell Biol*. 2006 Aug;26(15):5744–58.
132. Botti V, McNicoll F, Steiner MC, Richter FM, Solovyeva A, Wegener M, et al. Cellular differentiation state modulates the mRNA export activity of SR proteins. *J Cell Biol*. 2017 Jul 3;216(7):1993–2009.
133. Sinha R, Allemand E, Zhang Z, Karni R, Myers MP, Krainer AR. Arginine methylation controls the subcellular localization and functions of the oncoprotein splicing factor SF2/ASF. *Mol Cell Biol*. 2010 Jun;30(11):2762–74.
134. Kim S, Merrill BM, Rajpurohit R, Kumar A, Stone KL, Papov VV, et al. Identification of N(G)-methylarginine residues in human heterogeneous RNP protein A1: Phe/Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Gly-Gly/Phe is a preferred recognition motif. *Biochemistry*. 1997 Apr 29;36(17):5185–92.
135. Chen Y, Zhou X, Liu N, Wang C, Zhang L, Mo W, et al. Arginine methylation of hnRNP K enhances p53 transcriptional activity. *FEBS Lett*. 2008 May 28;582(12):1761–5.

136. Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, et al. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*. 2009 Aug 14;325(5942):834–40.
137. Edmond V, Moysan E, Khochbin S, Matthias P, Brambilla C, Brambilla E, et al. Acetylation and phosphorylation of SRSF2 control cell fate decision in response to cisplatin. *EMBO J*. 2011 Feb 2;30(3):510–23.
138. Wang F, Fu X, Chen P, Wu P, Fan X, Li N, et al. SPSB1-mediated HnRNP A1 ubiquitylation regulates alternative splicing and cell migration in EGF signaling. *Cell Res*. 2017 Apr;27(4):540–58.
139. Li T, Evdokimov E, Shen R-F, Chao C-C, Tekle E, Wang T, et al. Sumoylation of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, zinc finger proteins, and nuclear pore complex proteins: a proteomic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun 8;101(23):8551–6.
140. Lee SW, Lee MH, Park JH, Kang SH, Yoo HM, Ka SH, et al. SUMOylation of hnRNP-K is required for p53-mediated cell-cycle arrest in response to DNA damage. *EMBO J*. 2012 Nov 28;31(23):4441–52.
141. Pelisch F, Pozzi B, Risso G, Muñoz MJ, Srebrow A. DNA damage-induced heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K sumoylation regulates p53 transcriptional activation. *J Biol Chem*. 2012 Aug 31;287(36):30789–99.
142. Pelisch F, Gerez J, Druker J, Schor IE, Muñoz MJ, Risso G, et al. The serine/arginine-rich protein SF2/ASF regulates protein sumoylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Sep 14;107(37):16119–24.
143. Gui JF, Lane WS, Fu XD. A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. *Nature*. 1994 Jun 23;369(6482):678–82.
144. Ghosh G, Adams JA. Phosphorylation mechanism and structure of serine-arginine protein kinases. *FEBS J*. 2011 Feb;278(4):587–97.
145. Zhou Z, Fu X-D. Regulation of Splicing by SR proteins and SR Protein-Specific Kinases. *Chromosoma*. 2013 Jun;122(3):191–207.
146. Mermoud JE, Cohen P, Lamond AI. Ser/Thr-specific protein phosphatases are required for both catalytic steps of pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res*. 1992 Oct 25;20(20):5263–9.
147. Mermoud JE, Cohen PT, Lamond AI. Regulation of mammalian spliceosome assembly by a protein phosphorylation mechanism. *EMBO J*. 1994 Dec 1;13(23):5679–88.
148. Tacke R, Chen Y, Manley JL. Sequence-specific RNA binding by an SR protein requires RS domain phosphorylation: creation of an SRp40-specific splicing enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Feb 18;94(4):1148–53.

149. Corkery DP, Holly AC, Lahsae S, Dellaire G. Connecting the speckles: Splicing kinases and their role in tumorigenesis and treatment response. *Nucl Austin Tex.* 2015;6(4):279–88.
150. Aubol BE, Wu G, Keshwani MM, Movassat M, Fattet L, Hertel KJ, et al. Release of SR Proteins from CLK1 by SRPK1: A Symbiotic Kinase System for Phosphorylation Control of Pre-mRNA Splicing. *Mol Cell.* 2016 21;63(2):218–28.
151. Rossi F, Labourier E, Forné T, Divita G, Derancourt J, Riou JF, et al. Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I. *Nature.* 1996 May;381(6577):80–2.
152. Soret J, Gabut M, Dupon C, Kohlhagen G, Stévenin J, Pommier Y, et al. Altered Serine/Arginine-Rich Protein Phosphorylation and Exonic Enhancer-Dependent Splicing in Mammalian Cells Lacking Topoisomerase I. *Cancer Res.* 2003 Dec 1;63(23):8203–11.
153. Pilch B, Allemand E, Facompré M, Bailly C, Riou J-F, Soret J, et al. Specific Inhibition of Serine- and Arginine-rich Splicing Factors Phosphorylation, Spliceosome Assembly, and Splicing by the Antitumor Drug NB-506. *Cancer Res.* 2001 Sep 15;61(18):6876–84.
154. Blaustein M, Pelisch F, Tanos T, Muñoz MJ, Wengier D, Quadrana L, et al. Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT. *Nat Struct Mol Biol.* 2005 Dec;12(12):1037–44.
155. Patel NA, Kaneko S, Apostolatos HS, Bae SS, Watson JE, Davidowitz K, et al. Molecular and Genetic Studies Imply Akt-mediated Signaling Promotes Protein Kinase C $\beta$ II Alternative Splicing via Phosphorylation of Serine/Arginine-rich Splicing Factor SRp40. *J Biol Chem.* 2005 Aug 4;280(14):14302–9.
156. Kataoka N, Bachorik JL, Dreyfuss G. Transportin-SR, a nuclear import receptor for SR proteins. *J Cell Biol.* 1999 Jun 14;145(6):1145–52.
157. Lai MC, Lin RI, Huang SY, Tsai CW, Tarn WY. A human importin-beta family protein, transportin-SR2, interacts with the phosphorylated RS domain of SR proteins. *J Biol Chem.* 2000 Mar 17;275(11):7950–7.
158. Lin S, Xiao R, Sun P, Xu X, Fu X-D. Dephosphorylation-dependent sorting of SR splicing factors during mRNP maturation. *Mol Cell.* 2005 Nov 11;20(3):413–25.
159. Hedley ML, Amrein H, Maniatis T. An amino acid sequence motif sufficient for subnuclear localization of an arginine/serine-rich splicing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Dec 5;92(25):11524–8.
160. Stoilov P, Daoud R, Nayler O, Stamm S. Human tra2-beta1 autoregulates its protein concentration by influencing alternative splicing of its pre-mRNA. *Hum Mol Genet.* 2004 Mar 1;13(5):509–24.
161. Daoud R, Mies G, Smialowska A, Oláh L, Hossmann K-A, Stamm S. Ischemia induces a translocation of the splicing factor tra2-beta 1 and changes alternative

- splicing patterns in the brain. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2002 Jul 15;22(14):5889–99.
162. Li S-J, Qi Y, Zhao J-J, Li Y, Liu X-Y, Chen X-H, et al. Characterization of Nuclear Localization Signals (NLSs) and Function of NLSs and Phosphorylation of Serine Residues in Subcellular and Subnuclear Localization of Transformer-2 $\beta$  (Tra2 $\beta$ ). *J Biol Chem*. 2013 Mar 29;288(13):8898–909.
163. Yun CY, Velazquez-Dones AL, Lyman SK, Fu X-D. Phosphorylation-dependent and -independent nuclear import of RS domain-containing splicing factors and regulators. *J Biol Chem*. 2003 May 16;278(20):18050–5.
164. Michael WM, Eder PS, Dreyfuss G. The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein. *EMBO J*. 1997 Jun 16;16(12):3587–98.
165. van der Houven van Oordt W, Diaz-Meco MT, Lozano J, Krainer AR, Moscat J, Cáceres JF. The MKK(3/6)-p38-signaling cascade alters the subcellular distribution of hnRNP A1 and modulates alternative splicing regulation. *J Cell Biol*. 2000 Apr 17;149(2):307–16.
166. Ji Y, Tulin AV. Poly(ADP-ribosyl)ation of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins modulates splicing. *Nucleic Acids Res*. 2009 Jun;37(11):3501–13.
167. Gagné J-P, Hunter JM, Labrecque B, Chabot B, Poirier GG. A proteomic approach to the identification of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins as a new family of poly(ADP-ribose)-binding proteins. *Biochem J*. 2003 Apr 15;371(Pt 2):331–40.
168. Ji Y, Tulin AV. Post-transcriptional regulation by poly(ADP-ribosyl)ation of the RNA-binding proteins. *Int J Mol Sci*. 2013 Aug 5;14(8):16168–83.
169. Adamson B, Smogorzewska A, Sigoillot FD, King RW, Elledge SJ. A genome-wide homologous recombination screen identifies the RNA-binding protein RBMX as a component of the DNA damage response. *Nat Cell Biol*. 2012 Feb 19;14(3):318–28.
170. Malanga M, Czuby A, Girstun A, Staron K, Althaus FR. Poly(ADP-ribose) binds to the splicing factor ASF/SF2 and regulates its phosphorylation by DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*. 2008 Jul 18;283(29):19991–8.
171. Lee J-H, Paull TT. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science*. 2005 Apr 22;308(5721):551–4.
172. Cimprich KA, Cortez D. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Aug;9(8):616–27.
173. Brown EJ, Baltimore D. ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev*. 2000 Feb 15;14(4):397–402.

174. Falck J, Coates J, Jackson SP. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature*. 2005 Mar 31;434(7033):605–11.
175. Sulli G, Di Micco R, d'Adda di Fagagna F. Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(10):709–20.
176. Mattioli F, Vissers JHA, van Dijk WJ, Ikpa P, Citterio E, Vermeulen W, et al. RNF168 ubiquitinates K13-15 on H2A/H2AX to drive DNA damage signaling. *Cell*. 2012 Sep 14;150(6):1182–95.
177. Beck C, Robert I, Reina-San-Martin B, Schreiber V, Dantzer F. Poly(ADP-ribose) polymerases in double-strand break repair: focus on PARP1, PARP2 and PARP3. *Exp Cell Res*. 2014 Nov 15;329(1):18–25.
178. Sousa FG, Matuo R, Soares DG, Escargueil AE, Henriques JAP, Larsen AK, et al. PARPs and the DNA damage response. *Carcinogenesis*. 2012 Aug;33(8):1433–40.
179. Sprung CN, Li J, Hovan D, McKay MJ, Forrester HB. Alternative transcript initiation and splicing as a response to DNA damage. *PloS One*. 2011;6(10):e25758.
180. Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER, Hurov KE, Luo J, et al. ATM and ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage. *Science*. 2007 May 25;316(5828):1160–6.
181. Bensimon A, Schmidt A, Ziv Y, Elkon R, Wang S-Y, Chen DJ, et al. ATM-Dependent and -Independent Dynamics of the Nuclear Phosphoproteome After DNA Damage. *Sci Signal*. 2010 Dec 7;3(151):rs3–rs3.
182. Hinman MN, Lou H. Diverse molecular functions of Hu proteins. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2008 Oct;65(20):3168–81.
183. Akaike Y, Masuda K, Kuwano Y, Nishida K, Kajita K, Kurokawa K, et al. HuR Regulates Alternative Splicing of the TRA2 $\beta$  Gene in Human Colon Cancer Cells under Oxidative Stress. *Mol Cell Biol*. 2014 Aug;34(15):2857–73.
184. Best A, James K, Dalgliesh C, Hong E, Kheirolah-Kouhestani M, Curk T, et al. Human Tra2 proteins jointly control a *CHEK1* splicing switch among alternative and constitutive target exons. *Nat Commun*. 2014 Sep 11;5:4760.
185. Leva V, Giuliano S, Bardoni A, Camerini S, Crescenzi M, Lisa A, et al. Phosphorylation of SRSF1 is modulated by replicational stress. *Nucleic Acids Res*. 2012 Feb;40(3):1106–17.
186. Schwerk C, Schulze-Osthoff K. Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell*. 2005 Jul 1;19(1):1–13.
187. Revil T, Pelletier J, Toutant J, Cloutier A, Chabot B. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K represses the production of pro-apoptotic Bcl-xS splice isoform. *J Biol Chem*. 2009 Aug 7;284(32):21458–67.

188. Garneau D, Revil T, Fiset J-F, Chabot B. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F/H proteins modulate the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x. *J Biol Chem*. 2005 Jun 17;280(24):22641–50.
189. Shkreta L, Toutant J, Durand M, Manley JL, Chabot B. SRSF10 Connects DNA Damage to the Alternative Splicing of Transcripts Encoding Apoptosis, Cell-Cycle Control, and DNA Repair Factors. *Cell Rep*. 2016 Nov 15;17(8):1990–2003.
190. Muslin AJ, Tanner JW, Allen PM, Shaw AS. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell*. 1996 Mar 22;84(6):889–97.
191. Freeman AK, Morrison DK. 14-3-3 Proteins: Diverse Functions in Cell Proliferation and Cancer Progression. *Semin Cell Dev Biol*. 2011 Sep;22(7):681–7.
192. Cloutier P, Toutant J, Shkreta L, Goekjian S, Revil T, Chabot B. Antagonistic effects of the SRp30c protein and cryptic 5' splice sites on the alternative splicing of the apoptotic regulator Bcl-x. *J Biol Chem*. 2008 Aug 1;283(31):21315–24.
193. Moore MJ, Wang Q, Kennedy CJ, Silver PA. An alternative splicing network links cell-cycle control to apoptosis. *Cell*. 2010 Aug 20;142(4):625–36.
194. Bielli P, Bordi M, Di Biasio V, Sette C. Regulation of BCL-X splicing reveals a role for the polypyrimidine tract binding protein (PTBP1/hnRNP I) in alternative 5' splice site selection. *Nucleic Acids Res*. 2014 Oct 29;42(19):12070–81.
195. Pedrotti S, Busà R, Compagnucci C, Sette C. The RNA recognition motif protein RBM11 is a novel tissue-specific splicing regulator. *Nucleic Acids Res*. 2012 Feb;40(3):1021–32.
196. Cloutier A, Shkreta L, Toutant J, Durand M, Thibault P, Chabot B. hnRNP A1/A2 and Sam68 collaborate with SRSF10 to control the alternative splicing response to oxaliplatin-mediated DNA damage. *Sci Rep*. 2018 Feb 2;8(1):2206.
197. Dutertre M, Lambert S, Carreira A, Amor-Guélet M, Vagner S. DNA damage: RNA-binding proteins protect from near and far. *Trends Biochem Sci*. 2014 Mar 1;39(3):141–9.
198. Lal A, Abdelmohsen K, Pullmann R, Kawai T, Galban S, Yang X, et al. Posttranscriptional Derepression of GADD45 $\alpha$  by Genotoxic Stress. *Mol Cell*. 2006 Apr 7;22(1):117–28.
199. Li S, Kuhne WW, Kulharya A, Hudson FZ, Ha K, Cao Z, et al. Involvement of p54(nrb), a PSF partner protein, in DNA double-strand break repair and radioresistance. *Nucleic Acids Res*. 2009 Nov;37(20):6746–53.
200. Salton M, Lerenthal Y, Wang S-Y, Chen DJ, Shiloh Y. Involvement of Matrin 3 and SFPQ/NONO in the DNA damage response. *Cell Cycle Georget Tex*. 2010 Apr 15;9(8):1568–76.

201. Mastrocola AS, Kim SH, Trinh AT, Rodenkirch LA, Tibbetts RS. The RNA-binding protein fused in sarcoma (FUS) functions downstream of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in response to DNA damage. *J Biol Chem*. 2013 Aug 23;288(34):24731–41.
202. Naro C, Bielli P, Pagliarini V, Sette C. The interplay between DNA damage response and RNA processing: the unexpected role of splicing factors as gatekeepers of genome stability. *Front Genet* [Internet]. 2015 [cited 2018 Jul 8];6. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2015.00142/full>
203. Wang W-Y, Pan L, Su SC, Quinn EJ, Sasaki M, Jimenez JC, et al. Interaction of FUS and HDAC1 regulates DNA damage response and repair in neurons. *Nat Neurosci*. 2013 Oct;16(10):1383–91.
204. Qiu H, Lee S, Shang Y, Wang W-Y, Au KF, Kamiya S, et al. ALS-associated mutation FUS-R521C causes DNA damage and RNA splicing defects. *J Clin Invest*. 2014 Mar;124(3):981–99.
205. Gagné J-P, Pic E, Isabelle M, Krietsch J, Ethier C, Paquet E, et al. Quantitative proteomics profiling of the poly(ADP-ribose)-related response to genotoxic stress. *Nucleic Acids Res*. 2012 Sep;40(16):7788–805.
206. Kai M. Roles of RNA-Binding Proteins in DNA Damage Response. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2016 Feb 27;17(3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4813173/>
207. Jaafar L, Li Z, Li S, Dynan WS. SFPQ•NONO and XLF function separately and together to promote DNA double-strand break repair via canonical nonhomologous end joining. *Nucleic Acids Res*. 2017 Feb 28;45(4):1848–59.
208. Simon NE, Yuan M, Kai M. RNA-binding protein RBM14 regulates dissociation and association of non-homologous end joining proteins. *Cell Cycle Georget Tex*. 2017 Jun 18;16(12):1175–80.
209. Shin K-H, Kim RH, Kang MK, Kim RH, Kim SG, Lim PK, et al. p53 promotes the fidelity of DNA end-joining activity by, in part, enhancing the expression of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G. *DNA Repair*. 2007 Jun 1;6(6):830–40.
210. Sanz LA, Hartono SR, Lim YW, Steyaert S, Rajpurkar A, Ginno PA, et al. Prevalent, Dynamic, and Conserved R-Loop Structures Associate with Specific Epigenomic Signatures in Mammals. *Mol Cell*. 2016 07;63(1):167–78.
211. Nishida K, Kuwano Y, Nishikawa T, Masuda K, Rokutan K. RNA Binding Proteins and Genome Integrity. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2017 Jun 23;18(7). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5535834/>
212. Li X, Manley JL. Inactivation of the SR protein splicing factor ASF/SF2 results in genomic instability. *Cell*. 2005 Aug 12;122(3):365–78.

213. Sollier J, Stork CT, García-Rubio ML, Paulsen RD, Aguilera A, Cimprich KA. Transcription-coupled nucleotide excision repair factors promote R-loop-induced genome instability. *Mol Cell*. 2014 Dec 18;56(6):777–85.
214. Santos-Pereira JM, Herrero AB, García-Rubio ML, Marín A, Moreno S, Aguilera A. The Npl3 hnRNP prevents R-loop-mediated transcription-replication conflicts and genome instability. *Genes Dev*. 2013 Nov 15;27(22):2445–58.
215. Fagagna F d'Adda di, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Zglinicki T von, et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*. 2003 Nov;426(6963):194–8.
216. Blackburn EH, Epel ES, Lin J. Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science*. 2015 Dec 4;350(6265):1193–8.
217. Lange TD. Telomere-related Genome Instability in Cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2005 Jan 1;70:197–204.
218. Lazzerini-Denchi E, Sfeir A. Stop pulling my strings - what telomeres taught us about the DNA damage response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17(6):364–78.
219. Sfeir A, de Lange T. Removal of shelterin reveals the telomere end-protection problem. *Science*. 2012 May 4;336(6081):593–7.
220. Takahama K, Oyoshi T. Specific binding of modified RGG domain in TLS/FUS to G-quadruplex RNA: tyrosines in RGG domain recognize 2'-OH of the riboses of loops in G-quadruplex. *J Am Chem Soc*. 2013 Dec 4;135(48):18016–9.
221. Takahama K, Miyawaki A, Shitara T, Mitsuya K, Morikawa M, Hagihara M, et al. G-Quadruplex DNA- and RNA-Specific-Binding Proteins Engineered from the RGG Domain of TLS/FUS. *ACS Chem Biol*. 2015 Nov 20;10(11):2564–9.
222. Kittler R, Putz G, Pelletier L, Poser I, Heninger A-K, Drechsel D, et al. An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division. *Nature*. 2004 Dec 23;432(7020):1036–40.
223. Ma N, Matsunaga S, Morimoto A, Sakashita G, Urano T, Uchiyama S, et al. The nuclear scaffold protein SAF-A is required for kinetochore-microtubule attachment and contributes to the targeting of Aurora-A to mitotic spindles. *J Cell Sci*. 2011 Feb 1;124(Pt 3):394–404.
224. Kueng S, Hegemann B, Peters BH, Lipp JJ, Schleiffer A, Mechtler K, et al. Wapl controls the dynamic association of cohesin with chromatin. *Cell*. 2006 Dec 1;127(5):955–67.
225. Nishiyama T, Ladurner R, Schmitz J, Kreidl E, Schleiffer A, Bhaskara V, et al. Sororin Mediates Sister Chromatid Cohesion by Antagonizing Wapl. *Cell*. 2010 Nov 24;143(5):737–49.



226. Matsunaga S, Takata H, Morimoto A, Hayashihara K, Higashi T, Akatsuchi K, et al. RBMX: a regulator for maintenance and centromeric protection of sister chromatid cohesion. *Cell Rep*. 2012 Apr 19;1(4):299–308.
227. Choi H-H, Choi H-K, Jung SY, Hyle J, Kim B-J, Yoon K, et al. CHK2 kinase promotes pre-mRNA splicing via phosphorylating CDK11(p110). *Oncogene*. 2014 Jan 2;33(1):108–15.
228. Shkreta L, Michelle L, Toutant J, Tremblay ML, Chabot B. The DNA damage response pathway regulates the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x. *J Biol Chem*. 2011 Jan 7;286(1):331–40.
229. Wong A, Zhang S, Mordue D, Wu JM, Zhang Z, Darzynkiewicz Z, et al. PDIP38 is translocated to the spliceosomes/nuclear speckles in response to UV-induced DNA damage and is required for UV-induced alternative splicing of MDM2. *Cell Cycle Georget Tex*. 2013 Oct 1;12(19):3184–93.
230. Savage KI, Gorski JJ, Barros EM, Irwin GW, Manti L, Powell AJ, et al. Identification of a BRCA1-mRNA splicing complex required for efficient DNA repair and maintenance of genomic stability. *Mol Cell*. 2014 May 8;54(3):445–59.
231. Kleiman FE, Wu-Baer F, Fonseca D, Kaneko S, Baer R, Manley JL. BRCA1/BARD1 inhibition of mRNA 3' processing involves targeted degradation of RNA polymerase II. *Genes Dev*. 2005 May 15;19(10):1227–37.
232. Nagy E, Rigby WF. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase selectively binds AU-rich RNA in the NAD(+)-binding region (Rossmann fold). *J Biol Chem*. 1995 Feb 10;270(6):2755–63.
233. Garcin ED. GAPDH as a model non-canonical AU-rich RNA binding protein. *Semin Cell Dev Biol*. 2018 Mar 24;
234. Kanakkanthara A, Jeganathan KB, Limzerwala JF, Baker DJ, Hamada M, Nam H-J, et al. Cyclin A2 is an RNA binding protein that controls Mre11 mRNA translation. *Science*. 2016 30;353(6307):1549–52.
235. Hentze MW, Castello A, Schwarzl T, Preiss T. A brave new world of RNA-binding proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018 May;19(5):327–41.
236. Albihlal WS, Gerber AP. Unconventional RNA-binding proteins: an uncharted zone in RNA biology. *FEBS Lett [Internet]*. [cited 2018 Jul 20];0(0). Available from: <http://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1873-3468.13161>
237. Beckmann BM, Castello A, Medenbach J. The expanding universe of ribonucleoproteins: of novel RNA-binding proteins and unconventional interactions. *Pflüg Arch - Eur J Physiol*. 2016 Jun 1;468(6):1029–40.
238. Roizman B, Knipe D, Whitley R. Herpes simplex viruses. In: Knipe D, Howley P, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE. *Fields Virology*. 2007;2501–2601.

239. Dowling D, Nasr-Esfahani S, Tan CH, O'Brien K, Howard JL, Jans DA, et al. HIV-1 infection induces changes in expression of cellular splicing factors that regulate alternative viral splicing and virus production in macrophages. *Retrovirology*. 2008 Feb 4;5:18.
240. Cheunim T, Zhang J, Milligan SG, McPhillips MG, Graham SV. The alternative splicing factor hnRNP A1 is up-regulated during virus-infected epithelial cell differentiation and binds the human papillomavirus type 16 late regulatory element. *Virus Res*. 2008 Feb;131(2):189–98.
241. Huang T, Nilsson CE, Punga T, Akusjärvi G. Functional inactivation of the SR family of splicing factors during a vaccinia virus infection. *EMBO Rep*. 2002 Nov;3(11):1088–93.
242. Engelman A, Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol*. 2012 Mar 16;10(4):279–90.
243. Stoltzfus CM, Madsen JM. Role of viral splicing elements and cellular RNA binding proteins in regulation of HIV-1 alternative RNA splicing. *Curr HIV Res*. 2006 Jan;4(1):43–55.
244. Bilodeau PS, Domsic JK, Mayeda A, Krainer AR, Stoltzfus CM. RNA Splicing at Human Immunodeficiency Virus Type 1 3' Splice Site A2 Is Regulated by Binding of hnRNP A/B Proteins to an Exonic Splicing Silencer Element. *J Virol*. 2001 Sep 15;75(18):8487–97.
245. Gatto-Konczak FD, Olive M, Gesnel M-C, Breathnach R. hnRNP A1 Recruited to an Exon In Vivo Can Function as an Exon Splicing Silencer. *Mol Cell Biol*. 1999 Jan 1;19(1):251–60.
246. Black DL. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem*. 2003;72:291–336.
247. Paz S, Lu ML, Takata H, Trautmann L, Caputi M. SRSF1 RNA Recognition Motifs Are Strong Inhibitors of HIV-1 Replication. *J Virol*. 2015 Jun 15;89(12):6275–86.
248. Paz S, Krainer AR, Caputi M. HIV-1 transcription is regulated by splicing factor SRSF1. *Nucleic Acids Res*. 2014 Dec 16;42(22):13812–23.
249. Jacquenet S, Decimo D, Muriaux D, Darlix J-L. Dual effect of the SR proteins ASF/SF2, SC35 and 9G8 on HIV-1 RNA splicing and virion production. *Retrovirology*. 2005 May 22;2(1):33.
250. Mahiet C, Swanson CM. Control of HIV-1 gene expression by SR proteins. *Biochem Soc Trans*. 2016 Oct 15;44(5):1417–25.
251. Wentz MP, Moore BE, Cloyd MW, Berget SM, Donehower LA. A naturally arising mutation of a potential silencer of exon splicing in human immunodeficiency virus type 1 induces dominant aberrant splicing and arrests virus production. *J Virol*. 1997 Nov;71(11):8542–51.

252. Caputi M, Zahler AM. SR proteins and hnRNP H regulate the splicing of the HIV-1 tev-specific exon 6D. *EMBO J*. 2002 Feb 15;21(4):845–55.
253. Wong R, Balachandran A, Mao AY, Dobson W, Gray-Owen S, Cochrane A. Differential effect of CLK SR Kinases on HIV-1 gene expression: potential novel targets for therapy. *Retrovirology*. 2011 Jun 17;8:47.
254. Wong RW, Balachandran A, Ostrowski MA, Cochrane A. Digoxin suppresses HIV-1 replication by altering viral RNA processing. *PLoS Pathog*. 2013 Mar;9(3):e1003241.
255. Soret J, Bakkour N, Maire S, Durand S, Zekri L, Gabut M, et al. Selective modification of alternative splicing by indole derivatives that target serine-arginine-rich protein splicing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jun 14;102(24):8764–9.
256. Bakkour N, Lin Y-L, Maire S, Ayadi L, Mahuteau-Betzer F, Nguyen CH, et al. Small-molecule inhibition of HIV pre-mRNA splicing as a novel antiretroviral therapy to overcome drug resistance. *PLoS Pathog*. 2007 Oct 26;3(10):1530–9.
257. Cheung PK, Horhant D, Bandy LE, Zamiri M, Rabea SM, Karagiosov SK, et al. A Parallel Synthesis Approach to the Identification of Novel Diheteroarylamide-Based Compounds Blocking HIV Replication: Potential Inhibitors of HIV-1 Pre-mRNA Alternative Splicing. *J Med Chem*. 2016 Mar 10;59(5):1869–79.
258. Platt C, Calimano M, Nemet J, Bubenik J, Cochrane A. Differential Effects of Tra2 $\beta$  Isoforms on HIV-1 RNA Processing and Expression. *PloS One*. 2015;10(5):e0125315.
259. Shkreta L, Blanchette M, Toutant J, Wilhelm E, Bell B, Story BA, et al. Modulation of the splicing regulatory function of SRSF10 by a novel compound that impairs HIV-1 replication. *Nucleic Acids Res*. 2017 Apr 20;45(7):4051–67.
260. Tranell A, Fenyö EM, Schwartz S. Serine- and Arginine-rich Proteins 55 and 75 (SRp55 and SRp75) Induce Production of HIV-1 vpr mRNA by Inhibiting the 5'-Splice Site of Exon 3. *J Biol Chem*. 2010 Aug 10;285(41):31537–47.
261. Swanson CM, Sherer NM, Malim MH. SRp40 and SRp55 Promote the Translation of Unspliced Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA. *J Virol*. 2010 Jul 1;84(13):6748–59.
262. Pollard VW, Malim MH. The hiv-1 rev protein. *Annu Rev Microbiol*. 1998 Oct 1;52(1):491–532.
263. Nekhai S, Jeang K-T. Transcriptional and post-transcriptional regulation of HIV-1 gene expression: role of cellular factors for Tat and Rev. *Future Microbiol*. 2006 Dec;1(4):417–26.
264. Felber BK, Hadzopoulou-Cladaras M, Cladaras C, Copeland T, Pavlakis GN. rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA. *Proc Natl Acad Sci*. 1989 Mar 1;86(5):1495–9.

265. Ernst RK, Bray M, Rekosh D, Hammarskjöld ML. A structured retroviral RNA element that mediates nucleocytoplasmic export of intron-containing RNA. *Mol Cell Biol.* 1997 Jan 1;17(1):135–44.
266. Taniguchi I, Mabuchi N, Ohno M. HIV-1 Rev protein specifies the viral RNA export pathway by suppressing TAP/NXF1 recruitment. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jun 2;42(10):6645–58.
267. Taddeo B, Zhang W, Roizman B. The Herpes Simplex Virus Host Shutoff RNase Degrades Cellular and Viral mRNAs Made before Infection but Not Viral mRNA Made after Infection. *J Virol.* 2013 Apr 15;87(8):4516–22.
268. Escudero-Paunetto L, Li L, Hernandez FP, Sandri-Goldin RM. SR proteins SRp20 and 9G8 contribute to efficient export of herpes simplex virus 1 mRNAs. *Virology.* 2010 Jun 5;401(2):155–64.
269. Sandri-Goldin RM. The many roles of the highly interactive HSV protein ICP27, a key regulator of infection. *Future Microbiol.* 2011 Nov;6(11):1261–77.
270. Sciabica KS, Dai QJ, Sandri-Goldin RM. ICP27 interacts with SRPK1 to mediate HSV splicing inhibition by altering SR protein phosphorylation. *EMBO J.* 2003 Apr 1;22(7):1608–19.
271. Wadd S, Bryant H, Filhol O, Scott JE, Hsieh T-Y, Everett RD, et al. The Multifunctional Herpes Simplex Virus IE63 Protein Interacts with Heterogeneous Ribonucleoprotein K and with Casein Kinase 2. *J Biol Chem.* 1999 Aug 10;274(41):28991–8.
272. Koffa MD, Kean J, Zachos G, Rice SA, Clements JB. CK2 Protein Kinase Is Stimulated and Redistributed by Functional Herpes Simplex Virus ICP27 Protein. *J Virol.* 2003 Apr 1;77(7):4315–25.
273. Verma D, Bais S, Gaillard M, Swaminathan S. Epstein-Barr Virus SM Protein Utilizes Cellular Splicing Factor SRp20 To Mediate Alternative Splicing. *J Virol.* 2010 Nov 15;84(22):11781–9.
274. Key SCS, Yoshizaki T, Pagano JS. The Epstein-Barr Virus (EBV) SM Protein Enhances Pre-mRNA Processing of the EBV DNA Polymerase Transcript. *J Virol.* 1998 Nov 1;72(11):8485–92.
275. Majerciak V, Yamanegi K, Allemand E, Kruhlak M, Krainer AR, Zheng Z-M. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus ORF57 Functions as a Viral Splicing Factor and Promotes Expression of Intron-Containing Viral Lytic Genes in Spliceosome-Mediated RNA Splicing. *J Virol.* 2008 Mar 15;82(6):2792–801.
276. Majerciak V, Lu M, Li X, Zheng Z-M. Attenuation of the suppressive activity of cellular splicing factor SRSF3 by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus ORF57 protein is required for RNA splicing. *RNA.* 2014 Jan 11;20(11):1747–58.
277. Ham J, Dostatni N, Gauthier JM, Yaniv M. The papillomavirus E2 protein: a factor with many talents. *Trends Biochem Sci.* 1991 Nov;16(11):440–4.

278. Lai MC, Teh BH, Tarn WY. A human papillomavirus E2 transcriptional activator. The interactions with cellular splicing factors and potential function in pre-mRNA processing. *J Biol Chem*. 1999 Apr 23;274(17):11832–41.
279. Smith JA, White EA, Sowa ME, Powell MLC, Ottinger M, Harper JW, et al. Genome-wide siRNA screen identifies SMCX, EP400, and Brd4 as E2-dependent regulators of human papillomavirus oncogene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Feb 23;107(8):3752–7.
280. McBride AA. The Papillomavirus E2 Proteins. *Virology*. 2013 Oct;445(0):57–79.
281. Lai MM, Cavanagh D. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res*. 1997;48:1–100.
282. Chen C-Y, Chang C-K, Chang Y-W, Sue S-C, Bai H-I, Riang L, et al. Structure of the SARS coronavirus nucleocapsid protein RNA-binding dimerization domain suggests a mechanism for helical packaging of viral RNA. *J Mol Biol*. 2007 May 11;368(4):1075–86.
283. Zúñiga S, Sola I, Moreno JL, Sabella P, Plana-Durán J, Enjuanes L. Coronavirus nucleocapsid protein is an RNA chaperone. *Virology*. 2007 Jan 20;357(2):215–27.
284. Peng T-Y, Lee K-R, Tarn W-Y. Phosphorylation of the arginine/serine dipeptide-rich motif of the severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein modulates its multimerization, translation inhibitory activity and cellular localization. *FEBS J*. 2008 Aug;275(16):4152–63.
285. Calvo E, Escors D, López JA, González JM, Alvarez A, Arza E, et al. Phosphorylation and subcellular localization of transmissible gastroenteritis virus nucleocapsid protein in infected cells. *J Gen Virol*. 2005 Aug;86(Pt 8):2255–67.
286. Lan YT, Li J, Liao W, Ou J. Roles of the three major phosphorylation sites of hepatitis B virus core protein in viral replication. *Virology*. 1999 Jul 5;259(2):342–8.
287. Diab A, Foca A, Zoulim F, Durantel D, Andrisani O. The diverse functions of the hepatitis B core/capsid protein (HBc) in the viral life cycle: Implications for the development of HBc-targeting antivirals. *Antiviral Res*. 2018;149:211–20.
288. Liao W, Ou JH. Phosphorylation and nuclear localization of the hepatitis B virus core protein: significance of serine in the three repeated SPRRR motifs. *J Virol*. 1995 Feb;69(2):1025–9.
289. Zheng Y, Fu X, Ou J-HJ. Suppression of hepatitis B virus replication by SRPK1 and SRPK2 via a pathway independent of the phosphorylation of the viral core protein. *Virology*. 2005 Nov 10;342(1):150–8.
290. Diab A, Foca A, Fusil F, Lahlali T, Jalaguier P, Amirache F, et al. Polo-like-kinase 1 is a proviral host factor for hepatitis B virus replication. *Hepatology*. 2017 Dec 1;66(6):1750–65.

291. Daub H, Blencke S, Habenberger P, Kurtenbach A, Dennenmoser J, Wissing J, et al. Identification of SRPK1 and SRPK2 as the major cellular protein kinases phosphorylating hepatitis B virus core protein. *J Virol*. 2002 Aug;76(16):8124–37.
292. Gazina EV, Fielding JE, Lin B, Anderson DA. Core Protein Phosphorylation Modulates Pregenomic RNA Encapsidation to Different Extents in Human and Duck Hepatitis B Viruses. *J Virol*. 2000 May 15;74(10):4721–8.
293. OMS | Hépatite B [Internet]. WHO. [cited 2015 Sep 8]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/fr/>
294. Chang MS, Nguyen MH. Epidemiology of hepatitis B and the role of vaccination. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2017 Jun;31(3):239–47.
295. Pinkbook | Hepatitis B | Epidemiology of Vaccine Preventable Diseases | CDC [Internet]. [cited 2018 Jan 8]. Available from: <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/hepb.html>
296. Kidd-Ljunggren K, Holmberg A, Bläckberg J, Lindqvist B. High levels of hepatitis B virus DNA in body fluids from chronic carriers. *J Hosp Infect*. 2006 Dec;64(4):352–7.
297. Scott RM, Snitbhan R, Bancroft WH, Alter HJ, Tingpalapong M. Experimental transmission of hepatitis B virus by semen and saliva. *J Infect Dis*. 1980 Jul;142(1):67–71.
298. Dény P, Zoulim F. Hepatitis B virus: from diagnosis to treatment. *Pathol Biol (Paris)*. 2010 Aug;58(4):245–53.
299. Sunbul M. Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance. *World J Gastroenterol WJG*. 2014 May 14;20(18):5427–34.
300. Pontisso P, Poon MC, Tiollais P, Brechot C. Detection of hepatitis B virus DNA in mononuclear blood cells. *Br Med J Clin Res Ed*. 1984 May 26;288(6430):1563–6.
301. Dejean A, Lugassy C, Zafrani S, Tiollais P, Brechot C. Detection of hepatitis B virus DNA in pancreas, kidney and skin of two human carriers of the virus. *J Gen Virol*. 1984 Mar;65 ( Pt 3):651–5.
302. Féray C, Zignego AL, Samuel D, Bismuth A, Reynes M, Tiollais P, et al. Persistent hepatitis B virus infection of mononuclear blood cells without concomitant liver infection. The liver transplantation model. *Transplantation*. 1990 Jun;49(6):1155–8.
303. Michalak TI, Pardoe IU, Coffin CS, Churchill ND, Freake DS, Smith P, et al. Occult lifelong persistence of infectious hepadnavirus and residual liver inflammation in woodchucks convalescent from acute viral hepatitis. *Hepatology*. 1999 Mar;29(3):928–38.

304. Michalak TI, Mulrooney PM, Coffin CS. Low doses of hepadnavirus induce infection of the lymphatic system that does not engage the liver. *J Virol.* 2004 Feb;78(4):1730–8.
305. Locarnini S, Hatzakis A, Chen D-S, Lok A. Strategies to control hepatitis B: Public policy, epidemiology, vaccine and drugs. *J Hepatol.* 2015 Apr;62(1 Suppl):S76-86.
306. Mason WS, Gill US, Litwin S, Zhou Y, Peri S, Pop O, et al. HBV DNA Integration and Clonal Hepatocyte Expansion in Chronic Hepatitis B Patients Considered Immune Tolerant. *Gastroenterology.* 2016 Nov;151(5):986-998.e4.
307. Bertoletti A, Kennedy PTF, Durantel D. HBV infection and HCC: the “dangerous liaisons.” *Gut.* 2018;67(5):787–8.
308. Kwak M-S, Kim YJ. Occult hepatitis B virus infection. *World J Hepatol.* 2014 Dec 27;6(12):860–9.
309. Levrero M, Pollicino T, Petersen J, Belloni L, Raimondo G, Dandri M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2009 Sep;51(3):581–92.
310. Maupas P, Goudeau A, Coursaget P, Drucker J, Bagros P. Immunisation against hepatitis B in man. *Lancet Lond Engl.* 1976 Jun 26;1(7974):1367–70.
311. Micco L, Peppia D, Loggi E, Schurich A, Jefferson L, Cursaro C, et al. Differential boosting of innate and adaptive antiviral responses during pegylated-interferon-alpha therapy of chronic hepatitis B. *J Hepatol.* 2013 Feb;58(2):225–33.
312. Rang A, Günther S, Will H. Effect of interferon alpha on hepatitis B virus replication and gene expression in transiently transfected human hepatoma cells. *J Hepatol.* 1999 Nov;31(5):791–9.
313. Li J, Lin S, Chen Q, Peng L, Zhai J, Liu Y, et al. Inhibition of hepatitis B virus replication by MyD88 involves accelerated degradation of pregenomic RNA and nuclear retention of pre-S/S RNAs. *J Virol.* 2010 Jul;84(13):6387–99.
314. Wieland SF, Guidotti LG, Chisari FV. Intrahepatic induction of alpha/beta interferon eliminates viral RNA-containing capsids in hepatitis B virus transgenic mice. *J Virol.* 2000 May;74(9):4165–73.
315. Rijckborst V, Janssen HLA. The Role of Interferon in Hepatitis B Therapy. *Curr Hepat Rep.* 2010 Nov;9(4):231–8.
316. Woo ASJ, Kwok R, Ahmed T. Alpha-interferon treatment in hepatitis B. *Ann Transl Med [Internet].* 2017 Apr [cited 2018 Oct 19];5(7). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5401664/>
317. Fung J, Lai C-L, Seto W-K, Yuen M-F. Nucleoside/nucleotide analogues in the treatment of chronic hepatitis B. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Dec;66(12):2715–25.

318. Schinazi RF, Ehteshami M, Bassit L, Asselah T. Towards HBV curative therapies. *Liver Int.* 38(S1):102–14.
319. Durantel D, Zoulim F. New antiviral targets for innovative treatment concepts for hepatitis B virus and hepatitis delta virus. *J Hepatol.* 2016 Apr;64(1 Suppl):S117–31.
320. Blank A, Eidam A, Haag M, Hohmann N, Burhenne J, Schwab M, et al. The NTCP-inhibitor Myrcludex B: Effects on Bile Acid Disposition and Tenofovir Pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther.* 2018 Feb;103(2):341–8.
321. Bogomolov P, Alexandrov A, Voronkova N, Macievich M, Kokina K, Petrachenkova M, et al. Treatment of chronic hepatitis D with the entry inhibitor myrcludex B: First results of a phase Ib/IIa study. *J Hepatol.* 2016 Sep 1;65(3):490–8.
322. Lahlali T, Berke JM, Vergauwen K, Foca A, Vandyck K, Pauwels F, et al. Novel Potent Capsid Assembly Modulators Regulate Multiple Steps of the Hepatitis B Virus Life Cycle. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018 Oct;62(10).
323. Summers J, Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis B–like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell.* 1982 Jun;29(2):403–15.
324. Nassal M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut.* 2015 Jun 5;
325. Dane D, Cameron CN, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1970 ; 1: 695-8.
326. Seeger C, Zoulim F, Mason WS. *Felds Virology.* 2013;2185–221.
327. Cooper A, Shaul Y. Clathrin-mediated endocytosis and lysosomal cleavage of hepatitis B virus capsid-like core particles. *J Biol Chem.* 2006 Jun 16;281(24):16563–9.
328. Watanabe T, Sorensen EM, Naito A, Schott M, Kim S, Ahlquist P. Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jun 12;104(24):10205–10.
329. Luckenbaugh L, Kitrinou KM, Delaney WE, Hu J. Genome-free hepatitis B virion levels in patient sera as a potential marker to monitor response to antiviral therapy. *J Viral Hepat.* 2015 Jun;22(6):561–70.
330. Sommer G, van Bömmel F, Will H. Genotype-specific synthesis and secretion of spliced hepatitis B virus genomes in hepatoma cells. *Virology.* 2000 Jun 5;271(2):371–81.
331. Terré S, Petit MA, Bréchet C. Defective hepatitis B virus particles are generated by packaging and reverse transcription of spliced viral RNAs in vivo. *J Virol.* 1991 Oct;65(10):5539–43.



332. Soussan P, Pol J, Garreau F, Schneider V, Le Pendeven C, Nalpas B, et al. Expression of defective hepatitis B virus particles derived from singly spliced RNA is related to liver disease. *J Infect Dis.* 2008 Jul 15;198(2):218–25.
333. 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.* 1975 Nov;72(11):4597–601.
334. Robinson WS, Greenman RL. DNA polymerase in the core of the human hepatitis B virus candidate. *J Virol.* 1974 Jun;13(6):1231–6.
335. Lien JM, Petcu DJ, Aldrich CE, Mason WS. Initiation and termination of duck hepatitis B virus DNA synthesis during virus maturation. *J Virol.* 1987 Dec;61(12):3832–40.
336. Seeger C, Mason WS. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology.* 2015 May;479–480:672–86.
337. Staprans S, Loeb DD, Ganem D. Mutations affecting hepadnavirus plus-strand DNA synthesis dissociate primer cleavage from translocation and reveal the origin of linear viral DNA. *J Virol.* 1991 Mar;65(3):1255–62.
338. Yang W, Summers J. Illegitimate replication of linear hepadnavirus DNA through nonhomologous recombination. *J Virol.* 1995 Jul;69(7):4029–36.
339. Tu T, Budzinska MA, Shackel NA, Urban S. HBV DNA Integration: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Viruses* [Internet]. 2017 Apr 10 [cited 2018 Oct 19];9(4). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5408681/>
340. Jeong J-K, Yoon G-S, Ryu W-S. Evidence that the 5'-End Cap Structure Is Essential for Encapsidation of Hepatitis B Virus Pregenomic RNA. *J Virol.* 2000 Jun;74(12):5502–8.
341. Moolla N, Kew M, Arbuthnot P. Regulatory elements of hepatitis B virus transcription. *J Viral Hepat.* 2002 Sep;9(5):323–31.
342. Eble BE, MacRae DR, Lingappa VR, Ganem D. Multiple topogenic sequences determine the transmembrane orientation of the hepatitis B surface antigen. *Mol Cell Biol.* 1987 Oct;7(10):3591–601.
343. Le Duff Y, Blanchet M, Sureau C. The pre-S1 and antigenic loop infectivity determinants of the hepatitis B virus envelope proteins are functionally independent. *J Virol.* 2009 Dec;83(23):12443–51.
344. Bruss V, Ganem D. The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Feb 1;88(3):1059–63.
345. Meier A, Mehrle S, Weiss TS, Mier W, Urban S. Myristoylated PreS1-domain of the hepatitis B virus L-protein mediates specific binding to differentiated hepatocytes. *Hepatology* Baltim Md. 2013 Jul;58(1):31–42.

346. Lambert C, Prange R. Dual topology of the hepatitis B virus large envelope protein: determinants influencing post-translational pre-S translocation. *J Biol Chem.* 2001 Jun 22;276(25):22265–72.
347. Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife.* 2012;1:e00049.
348. Schulze A, Schieck A, Ni Y, Mier W, Urban S. Fine Mapping of Pre-S Sequence Requirements for Hepatitis B Virus Large Envelope Protein-Mediated Receptor Interaction. *J Virol.* 2010 Feb;84(4):1989–2000.
349. Crowther RA, Kiselev NA, Böttcher B, Berriman JA, Borisova GP, Ose V, et al. Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell.* 1994 Jun 17;77(6):943–50.
350. Wingfield PT, Stahl SJ, Williams RW, Steven AC. Hepatitis core antigen produced in *Escherichia coli*: subunit composition, conformational analysis, and in vitro capsid assembly. *Biochemistry.* 1995 Apr 18;34(15):4919–32.
351. Seitz S, Urban S, Antoni C, Böttcher B. Cryo-electron microscopy of hepatitis B virions reveals variability in envelope capsid interactions. *EMBO J.* 2007 Sep 19;26(18):4160–7.
352. Watts NR, Conway JF, Cheng N, Stahl SJ, Belnap DM, Steven AC, et al. The morphogenic linker peptide of HBV capsid protein forms a mobile array on the interior surface. *EMBO J.* 2002 Mar 1;21(5):876–84.
353. Lewellyn EB, Loeb DD. The Arginine Clusters of the Carboxy-Terminal Domain of the Core Protein of Hepatitis B Virus Make Pleiotropic Contributions to Genome Replication. *J Virol.* 2011 Feb 1;85(3):1298–309.
354. Yeh CT, Liaw YF, Ou JH. The arginine-rich domain of hepatitis B virus precore and core proteins contains a signal for nuclear transport. *J Virol.* 1990 Dec;64(12):6141–7.
355. Li H-C, Huang E-Y, Su P-Y, Wu S-Y, Yang C-C, Lin Y-S, et al. Nuclear export and import of human hepatitis B virus capsid protein and particles. *PLoS Pathog.* 2010;6(10):e1001162.
356. Guo Y-H, Li Y-N, Zhao J-R, Zhang J, Yan Z. HBc binds to the CpG islands of HBV cccDNA and promotes an epigenetic permissive state. *Epigenetics.* 2011 Jun 1;6(6):720–6.
357. Standing DN, Ou JH, Masiarz FR, Rutter WJ. A signal peptide encoded within the precore region of hepatitis B virus directs the secretion of a heterogeneous population of e antigens in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Nov;85(22):8405–9.
358. Zlotnick A, Tan Z, Selzer L. One protein, at least three structures, and many functions. *Struct Lond Engl* 1993. 2013 Jan 8;21(1):6–8.

359. DiMattia MA, Watts NR, Stahl SJ, Grimes JM, Steven AC, Stuart DI, et al. Antigenic Switching of Hepatitis B Virus by Alternative Dimerization of the Capsid Protein. *Struct Lond Engl* 1993. 2013 Jan 8;21(1):133–42.
360. Salfeld J, Pfaff E, Noah M, Schaller H. Antigenic determinants and functional domains in core antigen and e antigen from hepatitis B virus. *J Virol*. 1989 Feb;63(2):798–808.
361. Walsh R, Locarnini S. Hepatitis B precore protein: pathogenic potential and therapeutic promise. *Yonsei Med J*. 2012 Sep;53(5):875–85.
362. 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*. 2017 Aug;67(2):370–98.
363. Bonino F, Rosina F, Rizzetto M, Rizzi R, Chiaberge E, Tardanico R, et al. Chronic hepatitis in HBsAg carriers with serum HBV-DNA and anti-HBe. *Gastroenterology*. 1986 May;90(5 Pt 1):1268–73.
364. Hadziyannis SJ, Lieberman HM, Karvountzis GG, Shafritz DA. Analysis of liver disease, nuclear HBcAg, viral replication, and hepatitis B virus DNA in liver and serum of HBeAg Vs. anti-HBe positive carriers of hepatitis B virus. *Hepatol Baltim Md*. 1983 Oct;3(5):656–62.
365. Volz T, Lutgehetmann M, Wachtler P, Jacob A, Quaas A, Murray JM, et al. Impaired Intrahepatic Hepatitis B Virus Productivity Contributes to Low Viremia in Most HBeAg-Negative Patients. *Gastroenterology*. 2007 Sep;133(3):843–52.
366. Ducancelle A, Pivert A, Lunel-Fabiani F. Les mutants précore et du promoteur basal du core du virus de l'hépatite B. *Virologie*. 2011 May 1;15(2):100–14.
367. Nassal M. Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. *Virus Res*. 2008 Jun;134(1–2):235–49.
368. Zoulim F, Seeger C. Reverse transcription in hepatitis B viruses is primed by a tyrosine residue of the polymerase. *J Virol*. 1994 Jan;68(1):6–13.
369. Wang GH, Seeger C. The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis. *Cell*. 1992 Nov 13;71(4):663–70.
370. Wei X, Peterson DL. Expression, purification, and characterization of an active RNase H domain of the hepatitis B viral polymerase. *J Biol Chem*. 1996 Dec 20;271(51):32617–22.
371. Chen HS, Kaneko S, Girones R, Anderson RW, Hornbuckle WE, Tennant BC, et al. The woodchuck hepatitis virus X gene is important for establishment of virus infection in woodchucks. *J Virol*. 1993 Mar;67(3):1218–26.
372. Zoulim F, Saputelli J, Seeger C. Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo. *J Virol*. 1994 Mar;68(3):2026–30.

373. Keasler VV, Hodgson AJ, Madden CR, Slagle BL. Enhancement of Hepatitis B Virus Replication by the Regulatory X Protein In Vitro and In Vivo. *J Virol.* 2007 Mar;81(6):2656–62.
374. van Breugel PC, Robert EI, Mueller H, Decorsière A, Zoulim F, Hantz O, et al. Hepatitis B virus X protein stimulates gene expression selectively from extrachromosomal DNA templates. *Hepatology*. 2012 Dec;56(6):2116–24.
375. Wei Y, Neuveut C, Tiollais P, Buendia M-A. Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene. *Pathol Biol (Paris)*. 2010 Aug;58(4):267–72.
376. Fallot G, Neuveut C, Buendia M-A. Diverse roles of hepatitis B virus in liver cancer. *Curr Opin Virol.* 2012 Aug;2(4):467–73.
377. Tian Y, Yang W, Song J, Wu Y, Ni B. Hepatitis B virus X protein-induced aberrant epigenetic modifications contributing to human hepatocellular carcinoma pathogenesis. *Mol Cell Biol.* 2013 Aug;33(15):2810–6.
378. Decorsière A, Mueller H, van Breugel PC, Abdul F, Gerossier L, Beran RK, et al. Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor. *Nature.* 2016 Mar 17;531(7594):386–9.
379. Leistner CM, Gruen-Bernhard S, Glebe D. Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus. *Cell Microbiol.* 2008 Jan;10(1):122–33.
380. Sureau C, Salisse J. A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus a-determinant. *Hepatology*. 2013 Mar;57(3):985–94.
381. Verrier ER, Colpitts CC, Bach C, Heydmann L, Weiss A, Renaud M, et al. A targeted functional RNA interference screen uncovers glypican 5 as an entry factor for hepatitis B and D viruses. *Hepatology*. 2016 Jan;63(1):35–48.
382. Urban S, Bartenschlager R, Kubitz R, Zoulim F. Strategies to inhibit entry of HBV and HDV into hepatocytes. *Gastroenterology.* 2014 Jul;147(1):48–64.
383. Julithe R, Abou-Jaoudé G, Sureau C. Modification of the hepatitis B virus envelope protein glycosylation pattern interferes with secretion of viral particles, infectivity, and susceptibility to neutralizing antibodies. *J Virol.* 2014 Aug;88(16):9049–59.
384. 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.* 2012 Sep;86(17):9443–53.
385. Macovei A, Radulescu C, Lazar C, Petrescu S, Durantel D, Dwek RA, et al. Hepatitis B virus requires intact caveolin-1 function for productive infection in HepaRG cells. *J Virol.* 2010 Jan;84(1):243–53.
386. Gallucci L, Kann M. Nuclear Import of Hepatitis B Virus Capsids and Genome. *Viruses* [Internet]. 2017 Jan 21;9(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5294990/>

387. Faure-Dupuy S, Lucifora J, Durantel D. Interplay between the Hepatitis B Virus and Innate Immunity: From an Understanding to the Development of Therapeutic Concepts. *Viruses* [Internet]. 2017 Apr 28 [cited 2018 Aug 20];9(5). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5454408/>
388. Königer C, Wingert I, Marsmann M, Rösler C, Beck J, Nassal M. 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*. 2014 Oct 7;111(40):E4244-4253.
389. Cui X, McAllister R, Boregowda R, Sohn JA, Cortes Ledesma F, Caldecott KW, et al. Does Tyrosyl DNA Phosphodiesterase-2 Play a Role in Hepatitis B Virus Genome Repair? *PloS One*. 2015;10(6):e0128401.
390. Köck J, Rösler C, Zhang J-J, Blum HE, Nassal M, Thoma C. Generation of Covalently Closed Circular DNA of Hepatitis B Viruses via Intracellular Recycling Is Regulated in a Virus Specific Manner. *PLoS Pathog* [Internet]. 2010 Sep [cited 2015 Aug 22];6(9). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2932716/>
391. Kitamura K, Que L, Shimadu M, Koura M, Ishihara Y, Wakae K, et al. Flap endonuclease 1 is involved in cccDNA formation in the hepatitis B virus. *PLoS Pathog*. 2018 Jun;14(6):e1007124.
392. Qi Y, Gao Z, Xu G, Peng B, Liu C, Yan H, et al. DNA Polymerase  $\kappa$  Is a Key Cellular Factor for the Formation of Covalently Closed Circular DNA of Hepatitis B Virus. *PLoS Pathog* [Internet]. 2016 Oct 26 [cited 2018 Aug 21];12(10). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5081172/>
393. Bock CT, Schranz P, Schröder CH, Zentgraf H. Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell. *Virus Genes*. 1994 Jul;8(3):215–29.
394. Bock CT, Schwinn S, Locarnini S, Fyfe J, Manns MP, Trautwein C, et al. Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome1. *J Mol Biol*. 2001 Mar 16;307(1):183–96.
395. Belloni L, Pollicino T, De Nicola F, Guerrieri F, Raffa G, Fanciulli M, et al. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Nov 24;106(47):19975–9.
396. Hong X, Kim ES, Guo H. Epigenetic regulation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA: Implications for epigenetic therapy against chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2017;66(6):2066–77.
397. Lucifora J, Arzberger S, Durantel D, Belloni L, Strubin M, Levrero M, et al. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J Hepatol*. 2011 Nov;55(5):996–1003.

398. Weber M, Bronsema V, Bartos H, Bosserhoff A, Bartenschlager R, Schaller H. Hepadnavirus P protein utilizes a tyrosine residue in the TP domain to prime reverse transcription. *J Virol*. 1994 May;68(5):2994–9.
399. Zoulim F, Seeger C. Reverse transcription in hepatitis B viruses is primed by a tyrosine residue of the polymerase. *J Virol*. 1994 Jan;68(1):6–13.
400. Lien JM, Aldrich CE, Mason WS. Evidence that a capped oligoribonucleotide is the primer for duck hepatitis B virus plus-strand DNA synthesis. *J Virol*. 1986 Jan;57(1):229–36.
401. Will H, Reiser W, Weimer T, Pfaff E, Büscher M, Sprengel R, et al. Replication strategy of human hepatitis B virus. *J Virol*. 1987 Mar;61(3):904–11.
402. Perlman DH, Berg EA, O’connor PB, Costello CE, Hu J. Reverse transcription-associated dephosphorylation of hepadnavirus nucleocapsids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jun 21;102(25):9020–5.
403. Roseman AM, Berriman JA, Wynne SA, Butler PJG, Crowther RA. A structural model for maturation of the hepatitis B virus core. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Nov 1;102(44):15821–6.
404. Yang W, Summers J. Infection of ducklings with virus particles containing linear double-stranded duck hepatitis B virus DNA: illegitimate replication and reversion. *J Virol*. 1998 Nov;72(11):8710–7.
405. Yang W, Summers J. Integration of hepadnavirus DNA in infected liver: evidence for a linear precursor. *J Virol*. 1999 Dec;73(12):9710–7.
406. Bill CA, Summers J. Genomic DNA double-strand breaks are targets for hepadnaviral DNA integration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jul 27;101(30):11135–40.
407. Wooddell CI, Yuen M-F, Chan HL-Y, Gish RG, Locarnini SA, Chavez D, et al. RNAi-based treatment of chronically infected patients and chimpanzees reveals that integrated hepatitis B virus DNA is a source of HBsAg. *Sci Transl Med*. 2017 Sep 27;9(409).
408. Mason WS, Jilbert AR, Summers J. Clonal expansion of hepatocytes during chronic woodchuck hepatitis virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jan 25;102(4):1139–44.
409. Summers J, Mason WS. Residual integrated viral DNA after hepadnavirus clearance by nucleoside analog therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jan 13;101(2):638–40.
410. Mason WS, Liu C, Aldrich CE, Litwin S, Yeh MM. Clonal expansion of normal-appearing human hepatocytes during chronic hepatitis B virus infection. *J Virol*. 2010 Aug;84(16):8308–15.
411. Tu T, Mason WS, Clouston AD, Shackel NA, McCaughan GW, Yeh MM, et al. Clonal expansion of hepatocytes with a selective advantage occurs during all

- stages of chronic hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat.* 2015 Sep;22(9):737–53.
412. Tu T, Budzinska MA, Vondran FWR, Shackel NA, Urban S. Hepatitis B virus DNA integration occurs early in the viral life cycle in an in vitro infection model via NTCP-dependent uptake of enveloped virus particles. *J Virol.* 2018 Feb 7;JVI.02007-17.
413. Tuttleman JS, Pourcel C, Summers J. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell.* 1986 Nov 7;47(3):451–60.
414. Jiang B, Himmelsbach K, Ren H, Boller K, Hildt E. Subviral Hepatitis B Virus Filaments, like Infectious Viral Particles, Are Released via Multivesicular Bodies. *J Virol.* 2016 Mar 11;90(7):3330–41.
415. Chu C-M, Liaw Y-F. Intrahepatic distribution of hepatitis B surface and core antigens in chronic hepatitis B virus infection: Hepatocyte with cytoplasmic/membranous hepatitis B core antigen as a possible target for immune hepatocytolysis. *Gastroenterology.* 1987 Jan 1;92(1):220–5.
416. Nguyen T, Desmond P, Locarnini S. The role of quantitative hepatitis B serology in the natural history and management of chronic hepatitis B. *Hepatol Int.* 2009 Sep 18;3(1):5.
417. Belloni L, Li L, Palumbo GA, Chirapu SR, Calvo L, Finn MG, et al. HAPs hepatitis B virus (HBV) capsid inhibitors prevent HBc interaction with the viral minichromosome and selected host cell genes to inhibit transcription and affect cccDNA stability. *Dig Liver Dis.* 2014 Feb 1;46:e9.
418. Lubyova B, Hodek J, Zabransky A, Prouzova H, Hubalek M, Hirsch I, et al. PRMT5: A novel regulator of Hepatitis B virus replication and an arginine methylase of HBV core. *PloS One.* 2017;12(10):e0186982.
419. Zhang W, Chen J, Wu M, Zhang X, Zhang M, Yue L, et al. PRMT5 restricts hepatitis B virus replication through epigenetic repression of covalently closed circular DNA transcription and interference with pregenomic RNA encapsidation. *Hepatol Baltim Md.* 2017;66(2):398–415.
420. Guo Y, Kang W, Lei X, Li Y, Xiang A, Liu Y, et al. Hepatitis B viral core protein disrupts human host gene expression by binding to promoter regions. *BMC Genomics.* 2012 Oct 22;13:563.
421. Kwon JA, Rho HM. Transcriptional repression of the human p53 gene by hepatitis B viral core protein (HBc) in human liver cells. *Biol Chem.* 2003 Feb;384(2):203–12.
422. Du J, Liang X, Liu Y, Qu Z, Gao L, Han L, et al. Hepatitis B virus core protein inhibits TRAIL-induced apoptosis of hepatocytes by blocking DR5 expression. *Cell Death Differ.* 2009 Feb;16(2):219–29.

423. Sommer G, Heise T. Posttranscriptional control of HBV gene expression. *Front Biosci J Virtual Libr.* 2008;13:5533–47.
424. Huang J, Liang TJ. A novel hepatitis B virus (HBV) genetic element with Rev response element-like properties that is essential for expression of HBV gene products. *Mol Cell Biol.* 1993 Dec;13(12):7476–86.
425. Huang ZM, Yen TS. Role of the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element in export of intronless transcripts. *Mol Cell Biol.* 1995 Jul;15(7):3864–9.
426. Kuzembayeva M, Dilley K, Sardo L, Hu W-S. Life of psi: How full-length HIV-1 RNAs become packaged genomes in the viral particles. *Virology.* 2014 Apr;454–455:362–70.
427. Guang S, Mertz JE. Pre-mRNA processing enhancer (PPE) elements from intronless genes play additional roles in mRNA biogenesis than do ones from intron-containing genes. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(7):2215–26.
428. Zang WQ, Fieno AM, Grant RA, Yen TS. Identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a cellular protein that binds to the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element. *Virology.* 1998 Aug 15;248(1):46–52.
429. Zang WQ, Li B, Huang PY, Lai MM, Yen TS. Role of polypyrimidine tract binding protein in the function of the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element. *J Virol.* 2001 Nov;75(22):10779–86.
430. Heise T, Guidotti LG, Chisari FV. La Autoantigen Specifically Recognizes a Predicted Stem-Loop in Hepatitis B Virus RNA. *J Virol.* 1999 Jul 1;73(7):5767–76.
431. Fok V, Friend K, Steitz JA. Epstein-Barr virus noncoding RNAs are confined to the nucleus, whereas their partner, the human La protein, undergoes nucleocytoplasmic shuttling. *J Cell Biol.* 2006 May 8;173(3):319–25.
432. Yang C-C, Huang E-Y, Li H-C, Su P-Y, Shih C. Nuclear Export of Human Hepatitis B Virus Core Protein and Pregenomic RNA Depends on the Cellular NXF1-p15 Machinery. Palazzo AF, editor. *PLoS ONE.* 2014 Oct 31;9(10):e106683.
433. Hatton T, Zhou S, Standring DN. RNA- and DNA-binding activities in hepatitis B virus capsid protein: a model for their roles in viral replication. *J Virol.* 1992 Sep;66(9):5232–41.
434. Ehlers I, Horke S, Reumann K, Rang A, Grosse F, Will H, et al. Functional characterization of the interaction between human La and hepatitis B virus RNA. *J Biol Chem.* 2004 Oct 15;279(42):43437–47.
435. Heise T, Guidotti LG, Chisari FV. Characterization of nuclear RNases that cleave hepatitis B virus RNA near the La protein binding site. *J Virol.* 2001 Aug;75(15):6874–83.



436. Mao R, Nie H, Cai D, Zhang J, Liu H, Yan R, et al. Inhibition of hepatitis B virus replication by the host zinc finger antiviral protein. *PLoS Pathog.* 2013;9(7):e1003494.
437. Su TS, Lai CJ, Huang JL, Lin LH, Yauk YK, Chang CM, et al. Hepatitis B virus transcript produced by RNA splicing. *J Virol.* 1989 Sep;63(9):4011–8.
438. Hass M, Hannoun C, Kalinina T, Sommer G, Manegold C, Günther S. Functional analysis of hepatitis B virus reactivating in hepatitis B surface antigen-negative individuals. *Hepatology*. 2005 Jul;42(1):93–103.
439. Candotti D, Allain J-P. Biological and clinical significance of hepatitis B virus RNA splicing: an update. *Ann Blood* [Internet]. 2017 May 31 [cited 2017 Oct 17];2(4). Available from: <http://aob.amegroups.com/article/view/3845>
440. Ogston CW, Razman DG. Spliced RNA of woodchuck hepatitis virus. *Virology.* 1992 Jul;189(1):245–52.
441. Hantz O, Baginski I, Fourel I, Chemin I, Trepo C. Viral spliced RNA are produced, encapsidated and reverse transcribed during in vivo woodchuck hepatitis virus infection. *Virology.* 1992 Sep;190(1):193–200.
442. Wu HL, Chen PJ, Tu SJ, Lin MH, Lai MY, Chen DS. Characterization and genetic analysis of alternatively spliced transcripts of hepatitis B virus in infected human liver tissues and transfected HepG2 cells. *J Virol.* 1991 Apr;65(4):1680–6.
443. 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.* 1990 Dec;179(2):881–5.
444. Huang C-C, Kuo T-M, Yeh C-T, Hu C-P, Chen Y-L, Tsai Y-L, et al. One single nucleotide difference alters the differential expression of spliced RNAs between HBV genotypes A and D. *Virus Res.* 2013 Jun;174(1–2):18–26.
445. El Chaar M, El Jisr T, Allain J-P. Hepatitis B virus DNA splicing in Lebanese blood donors and genotype A to E strains: implications for hepatitis B virus DNA quantification and infectivity. *J Clin Microbiol.* 2012 Oct;50(10):3159–67.
446. Cox LE, Arslan O, Allain J-P. Characterization of hepatitis B virus in Turkish blood donors, and the prevalence of the SP1 splice variant. *J Med Virol.* 2011 Aug;83(8):1321–5.
447. Rosmorduc O, Petit MA, Pol S, Capel F, Bortolotti F, Berthelot P, et al. In vivo and in vitro expression of defective hepatitis B virus particles generated by spliced hepatitis B virus RNA. *Hepatology*. 1995 Jul;22(1):10–9.
448. Ma Z-M, Lin X, Wang Y-X, Tian X-C, Xie Y-H, Wen Y-M. A double-spliced defective hepatitis B virus genome derived from hepatocellular carcinoma tissue enhanced replication of full-length virus. *J Med Virol.* 2009 Feb;81(2):230–7.

449. Heise T, Sommer G, Reumann K, Meyer I, Will H, Schaal H. The hepatitis B virus PRE contains a splicing regulatory element. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(1):353–63.
450. Spellman R, Rideau A, Matlin A, Gooding C, Robinson F, McGlincy N, et al. Regulation of alternative splicing by PTB and associated factors. *Biochem Soc Trans.* 2005 Jun;33(Pt 3):457–60.
451. Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jul 1;31(13):3568–71.
452. Smith PJ, Zhang C, Wang J, Chew SL, Zhang MQ, Krainer AR. An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers. *Hum Mol Genet.* 2006 Aug 15;15(16):2490–508.
453. Sheen I-S, Tsou Y-K, Lin S-M, Lin C-J, Lin C-C, Hsu C-W, et al. Nuclear HBcAg and histology activity index as independent predictors of the expression of singly spliced HBV-RNA. *J Viral Hepat.* 2007 Jan;14(1):70–4.
454. Le Pogam S, Chua PK, Newman M, Shih C. Exposure of RNA templates and encapsidation of spliced viral RNA are influenced by the arginine-rich domain of human hepatitis B virus core antigen (HBcAg 165-173). *J Virol.* 2005 Feb;79(3):1871–87.
455. Mabit H, Knaust A, Breiner KM, Schaller H. Nuclear localization of the duck hepatitis B virus capsid protein: detection and functional implications of distinct subnuclear bodies in a compartment associated with RNA synthesis and maturation. *J Virol.* 2003 Feb;77(3):2157–64.
456. Günther S, Sommer G, Iwanska A, Will H. Heterogeneity and common features of defective hepatitis B virus genomes derived from spliced pregenomic RNA. *Virology.* 1997 Nov 24;238(2):363–71.
457. Tsai K-N, Chong C-L, Chou Y-C, Huang C-C, Wang Y-L, Wang S-W, et al. Doubly Spliced RNA of Hepatitis B Virus Suppresses Viral Transcription via TATA-Binding Protein and Induces Stress Granule Assembly. *J Virol.* 2015 Nov;89(22):11406–19.
458. Yuan TT, Lin MH, Chen DS, Shih C. A defective interference-like phenomenon of human hepatitis B virus in chronic carriers. *J Virol.* 1998 Jan;72(1):578–84.
459. Pan M-H, Hu H-H, Mason H, Bayliss J, Littlejohn M, Lin Y-L, et al. FRI-256 - Hepatitis B splice variants are strongly associated with and are indeed predictive of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2018 Apr 1;68:S474–5.
460. Chen J, Wu M, Wang F, Zhang W, Wang W, Zhang X, et al. Hepatitis B virus spliced variants are associated with an impaired response to interferon therapy. *Sci Rep [Internet].* 2015 Nov 20 [cited 2018 Sep 1];5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4653653/>

461. Huang HL, Jeng KS, Hu CP, Tsai CH, Lo SJ, Chang C. Identification and characterization of a structural protein of hepatitis B virus: a polymerase and surface fusion protein encoded by a spliced RNA. *Virology*. 2000 Sep 30;275(2):398–410.
462. Park G-S, Kim H-Y, Shin H-S, Park S, Shin H-J, Kim K. Modulation of hepatitis B virus replication by expression of polymerase-surface fusion protein through splicing: implications for viral persistence. *Virus Res*. 2008 Sep;136(1–2):166–74.
463. Chen W-N, Chen J-Y, Lin W-S, Lin J-Y, Lin X. Hepatitis B doubly spliced protein, generated by a 2.2 kb doubly spliced hepatitis B virus RNA, is a pleiotropic activator protein mediating its effects via activator protein-1- and CCAAT/enhancer-binding protein-binding sites. *J Gen Virol*. 2010 Oct;91(Pt 10):2592–600.
464. Bayard F, Godon O, Nalpas B, Costentin C, Zhu R, Soussan P, et al. T-cell responses to hepatitis B splice-generated protein of hepatitis B virus and inflammatory cytokines/chemokines in chronic hepatitis B patients. ANRS study: HB EP 02 HBSP-FIBRO. *J Viral Hepat*. 2012 Dec;19(12):872–80.
465. Soussan P, Garreau F, Zylberberg H, Ferray C, Brechot C, Kremsdorf D. In vivo expression of a new hepatitis B virus protein encoded by a spliced RNA. *J Clin Invest*. 2000 Jan;105(1):55–60.
466. Lu YW, Tan TL, Chan V, Chen WN. The HBSP gene is expressed during HBV replication, and its coded BH3-containing spliced viral protein induces apoptosis in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Dec 8;351(1):64–70.
467. Lu YW, Ren YD, Bai J, Chen WN. The spliced variant of hepatitis B virus protein, HBSP, interacts with Bcl-2/Bcl-xl in vitro and induces apoptosis in HepG2 cells. *IUBMB Life*. 2008 Oct;60(10):700–2.
468. Soussan P, Tuveri R, Nalpas B, Garreau F, Zavala F, Masson A, 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 Hepatol*. 2003 Mar;38(3):343–8.
469. Chen J-Y, Chen W-N, Liu L-L, Lin W-S, Jiao B-Y, Wu Y-L, et al. Hepatitis B spliced protein (HBSP) generated by a spliced hepatitis B virus RNA participates in abnormality of fibrin formation and functions by binding to fibrinogen  $\gamma$  chain. *J Med Virol*. 2010 Dec;82(12):2019–26.
470. Chen W-N, Chen J-Y, Jiao B-Y, Lin W-S, Wu Y-L, Liu L-L, et al. Interaction of the hepatitis B spliced protein with cathepsin B promotes hepatoma cell migration and invasion. *J Virol*. 2012 Dec;86(24):13533–41.
471. Pol JG, Lekbaby B, Redelsperger F, Klamer S, Mandouri Y, Ahodantin J, et al. Alternative splicing-regulated protein of hepatitis B virus hacks the TNF- $\alpha$ -stimulated signaling pathways and limits the extent of liver inflammation. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2015 May;29(5):1879–89.

472. Duriez M, Mandouri Y, Lekbaby B, Wang H, Schnuriger A, Redelsperger F, et al. Alternative splicing of hepatitis B virus: A novel virus/host interaction altering liver immunity. *J Hepatol*. 2017 Oct;67(4):687–99.
473. Eckhardt SG, Milich DR, McLachlan A. Hepatitis B virus core antigen has two nuclear localization sequences in the arginine-rich carboxyl terminus. *J Virol*. 1991 Feb;65(2):575–82.
474. Galganski L, Urbanek MO, Krzyzosiak WJ. Nuclear speckles: molecular organization, biological function and role in disease. *Nucleic Acids Res*. 2017 Oct 13;45(18):10350–68.
475. Spector DL, Lamond AI. Nuclear Speckles. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2011 Feb [cited 2018 Aug 16];3(2). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3039535/>
476. Landeras-Bueno S, Jorba N, Pérez-Cidoncha M, Ortín J. The splicing factor proline-glutamine rich (SFPQ/PSF) is involved in influenza virus transcription. *PLoS Pathog*. 2011 Nov;7(11):e1002397.
477. Hegele A, Kamburov A, Grossmann A, Sourlis C, Wowro S, Weimann M, et al. Dynamic Protein-Protein Interaction Wiring of the Human Spliceosome. *Mol Cell*. 2012 Feb 24;45(4):567–80.
478. Venables JP, Elliott DJ, Makarova OV, Makarov EM, Cooke HJ, Eperon IC. RBMY, a probable human spermatogenesis factor, and other hnRNP G proteins interact with Tra2beta and affect splicing. *Hum Mol Genet*. 2000 Mar 22;9(5):685–94.
479. ASPCR - RNomics Platform [Internet]. [cited 2018 Oct 22]. Available from: <https://rnomics.med.usherbrooke.ca/services/aspcr>
480. Su TS, Lui WY, Lin LH, Han SH, P'eng FK. Analysis of hepatitis B virus transcripts in infected human livers. *Hepatol Baltim Md*. 1989 Feb;9(2):180–5.
481. Shin C, Feng Y, Manley JL. Dephosphorylated SRp38 acts as a splicing repressor in response to heat shock. *Nature*. 2004 Feb 5;427(6974):553–8.
482. Zhou X, Wu W, Wei N, Cheng Y, Xie Z, Feng Y. Genome-wide analysis of SRSF10-regulated alternative splicing by deep sequencing of chicken transcriptome. *Genomics Data*. 2014 Dec 1;2:20–3.
483. Alfaiate D, Dény P, Durantel D. Hepatitis delta virus: From biological and medical aspects to current and investigational therapeutic options. *Antiviral Res*. 2015 Oct 1;122:112–29.
484. Berke JM, Dehertogh P, Vergauwen K, Van Damne E, Mostmans W, Vandyck K, et al. Capsid Assembly Modulators Have a Dual Mechanism of Action in Primary Human Hepatocytes Infected with Hepatitis B Virus. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Jul 25;e00560-17.

485. 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 Mar 14;343(6176):1221–8.
486. Wang W-H, Hullinger RL, Andrisani OM. Hepatitis B virus X protein via the p38MAPK pathway induces E2F1 release and ATR kinase activation mediating p53 apoptosis. *J Biol Chem*. 2008 Sep 12;283(37):25455–67.
487. Tremblay M-P, Armero VES, Allaire A, Boudreault S, Martenon-Brodeur C, Durand M, et al. Global profiling of alternative RNA splicing events provides insights into molecular differences between various types of hepatocellular carcinoma. *BMC Genomics*. 2016 Aug 26;17:683.
488. Fedorov O, Huber K, Eisenreich A, Filippakopoulos P, King O, Bullock AN, et al. Specific CLK inhibitors from a novel chemotype for regulation of alternative splicing. *Chem Biol*. 2011 Jan 28;18(1):67–76.
489. Sako Y, Ninomiya K, Okuno Y, Toyomoto M, Nishida A, Koike Y, et al. Development of an orally available inhibitor of CLK1 for skipping a mutated dystrophin exon in Duchenne muscular dystrophy. *Sci Rep*. 2017 30;7:46126.
490. Lin J-C. Therapeutic Applications of Targeted Alternative Splicing to Cancer Treatment. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2017 Dec 28 [cited 2018 Oct 28];19(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5796025/>
491. Dion S, Bourguin 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*. 2013 May;87(10):5554–63.
492. Lucifora J, Salvetti A, Marniquet X, Mailly L, Testoni B, Fusil F, 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*. 2017 Sep;145:14–9.
493. Kremsdorf D, Strick-Marchand H. Modeling hepatitis virus infections and treatment strategies in humanized mice. *Curr Opin Virol*. 2017;25:119–25.
494. 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 Nov 26;99(24):15655–60.
495. Hantz O, Parent R, Durantel D, Gripon P, Guguen-Guillouzo C, Zoulim F. Persistence of the hepatitis B virus covalently closed circular DNA in HepaRG human hepatocyte-like cells. *J Gen Virol*. 2009 Jan;90(Pt 1):127–35.
496. Sun Y, Qi Y, Peng B, Li W. NTCP-Reconstituted In Vitro HBV Infection System. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2017;1540:1–14.
497. Lecluyse EL, Alexandre E. Isolation and culture of primary hepatocytes from resected human liver tissue. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2010;640:57–82.

498. Luangsay S, Gruffaz M, Isorce N, Testoni B, Michelet M, Faure-Dupuy S, et al. Early inhibition of hepatocyte innate responses by hepatitis B virus. *J Hepatol*. 2015 Dec 1;63(6):1314–22.
499. Sureau C. The use of hepatocytes to investigate HDV infection: the HDV/HepaRG model. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2010;640:463–73.
500. Protein Purification with Strep-Tactin® | IBA Lifesciences [Internet]. [cited 2018 Oct 23]. Available from: <https://www.iba-lifesciences.com/strep-tactin-system-technology.html>
501. Salvetti A, Couté Y, Epstein A, Arata L, Kraut A, Navratil V, et al. Nuclear Functions of Nucleolin through Global Proteomics and Interactomic Approaches. *J Proteome Res*. 2016 06;15(5):1659–69.
502. Scholtes C, Icard V, Amiri M, Chevallier-Queyron P, Trabaud M-A, Ramière C, et al. Standardized one-step real-time reverse transcription-PCR assay for universal detection and quantification of hepatitis delta virus from clinical samples in the presence of a heterologous internal-control RNA. *J Clin Microbiol*. 2012 Jun;50(6):2126–8.
503. Brosseau J-P, Lucier J-F, Lapointe E, Durand M, Gendron D, Gervais-Bird J, et al. High-throughput quantification of splicing isoforms. *RNA N Y N*. 2010 Feb;16(2):442–9.
504. Prinos P, Garneau D, Lucier J-F, Gendron D, Couture S, Boivin M, et al. Alternative splicing of SYK regulates mitosis and cell survival. *Nat Struct Mol Biol*. 2011 Jun;18(6):673–9.

# REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci à mes rapporteurs, Christine Neuveut et Patrick Soussan, pour leur relecture et leur intérêt pour ce travail. Merci à Benoit Chabot, pour son implication dans le projet, sa disponibilité, et sa participation à mon jury. Merci à Mathias Faure d'avoir accepté de présider mon jury.

Je remercie aussi Fabien Zoulim pour son accueil au sein de son équipe « Pathogenèse des Hépatites Virales ».

Bien sûr, je remercie particulièrement ma directrice de thèse, Anna Salvetti, pour son accompagnement depuis le master, et durant ces trois années de thèse. Votre enthousiasme pour toutes les nouvelles pistes de recherche qui se sont dessinées tout au long de ma thèse a été très stimulant et motivant. Je vous remercie aussi pour votre soutien, votre temps et vos enseignements scientifiques très précieux.

Je souhaite aussi remercier nos collaborateurs pour leur implication dans ce projet. Yohann Couté et Lucid Belmudes pour leur travail sur la protéomique, leurs conseils et leur aide pour répondre aux nouvelles problématiques. Merci à Christophe Combet et Yujin Kim pour leurs analyses bioinformatiques qui ont participées à l'orientation du projet. Je remercie aussi David Grierson et Lee D. Arnold pour leur collaboration.

De plus, je remercie les membres de mon comité de suivi de thèse, Janet Hall, Bernard Lopez et Massimo Levrero pour leurs conseils et leur intérêt pour mon projet de thèse.

J'aimerais ensuite remercier Serena, « ma » première post-doc. Merci pour ton soutien, dans le travail et bien au-delà, pour les soirées réconfortantes après les longues journées au labo, à base de sushis ou de lasagnes et de grandes discussions qui guérissaient toute baisse de moral !

Un peu plus tard est arrivée Héroïse pour continuer le projet, un rayon de soleil avec son optimisme à toute épreuve et sa gentillesse sans faille. Héroïse je te remercie pour tout, ton amitié et tes encouragements !

Je voudrais ensuite remercier tous les membres de l'équipe JAD. David et Julie pour leur soutien et leur confiance. Avec trois chercheurs aussi passionnés, je souhaite le meilleur à cette équipe, avec une longue série de JAD00XX ! Merci à Thomas pour ton investissement dans le projet et ton aide tout le long de ma thèse. Merci à Inès et Mathieu, deux Super-stagiaires, qui ont été d'une grande aide pour raccourcir la liste sans fin des manips ! Merci à Maud, Caroline, Rayan, Adrien, Brioux, Ariel, Marion et Manon pour leur aide et leurs conseils.

Oui il manque des JAD, mais ils arrivent dans les remerciements spéciaux du bureau où j'ai passé trois ans accompagnée des meilleurs ! Laura, merci pour ta bonne humeur, ton aide et ton écoute. Emma, d'abord, merci pour la formation PBS qui a été une révélation scientifique, bien sûr pour les soirées l'Amour est dans le pré, et pour tous ces bons moments passés ensemble. Merci à Loïc pour ta gentillesse bien réelle derrière ton exubérante et légèrement flippante folie ! Merci à Audrey, pour les multiples explications TaqMan notamment ^^ . Merci aussi à Ludo le Pirate presque parti voguer vers de nouvelles contrées. Avec une caisse de Rhum et de pDC, la mer est à toi !

Merci aux Annexiens qui forment un peuple à part, auprès duquel on trouve toujours un sourire, une oreille attentive et de la nourriture insulino-stimulante ! Un grand merci à Susu pour tous tes conseils et ton soutien. Merci à Aurore, Fleur et Léa, la team footing/renfo : MO-TI-VA-TION ! Merci à Maëlle, Océane, Damien, Romain, Guada, Bernt...

Merci à la team PHH qui passe des heures pour les manips de tout le monde, toujours dans la bonne humeur : Maud, Jennifer, Anaëlle, Océane, Laura, Julie, Marie-Laure, Judith !

Je voudrais remercier Marie-Agnès pour les nombreuses questions que tu as résolues et pour ton aide tout au long de ma thèse. Merci à Christophe pour sa disponibilité son aide toujours rapide et souriante. Merci aussi à Isabelle Bordes pour son aide et sa patience face aux épreuves de l'autoclave ou tout autre tracas.



Je veux aussi remercier Axel, Thibaut, Chloé, Vincent, Sonia, thésards passionnés de l'ENS : votre aide et nos discussions scientifiques pendant mon master m'ont beaucoup enrichie et aidée pendant ma thèse. Merci pour tous ces moments pimentés par vos grains de folie respectifs !

Je voudrais enfin remercier tous mes proches pour leur soutien inconditionnel depuis si longtemps. Mes parents, pour toute la force et la volonté que vous m'avez transmis, et votre soutien sans faille durant mes longues études !! Céline et Etienne, merci d'être présents, toujours, et pour vos mots justes, toujours. Le lien qui nous unit est inestimable. Merci aussi pour vos corrections du manuscrit ! Je remercie aussi tous mes amis, en particulier Céline et Vanessa pour leur soutien, leur bienveillance et leur amitié très précieuse.

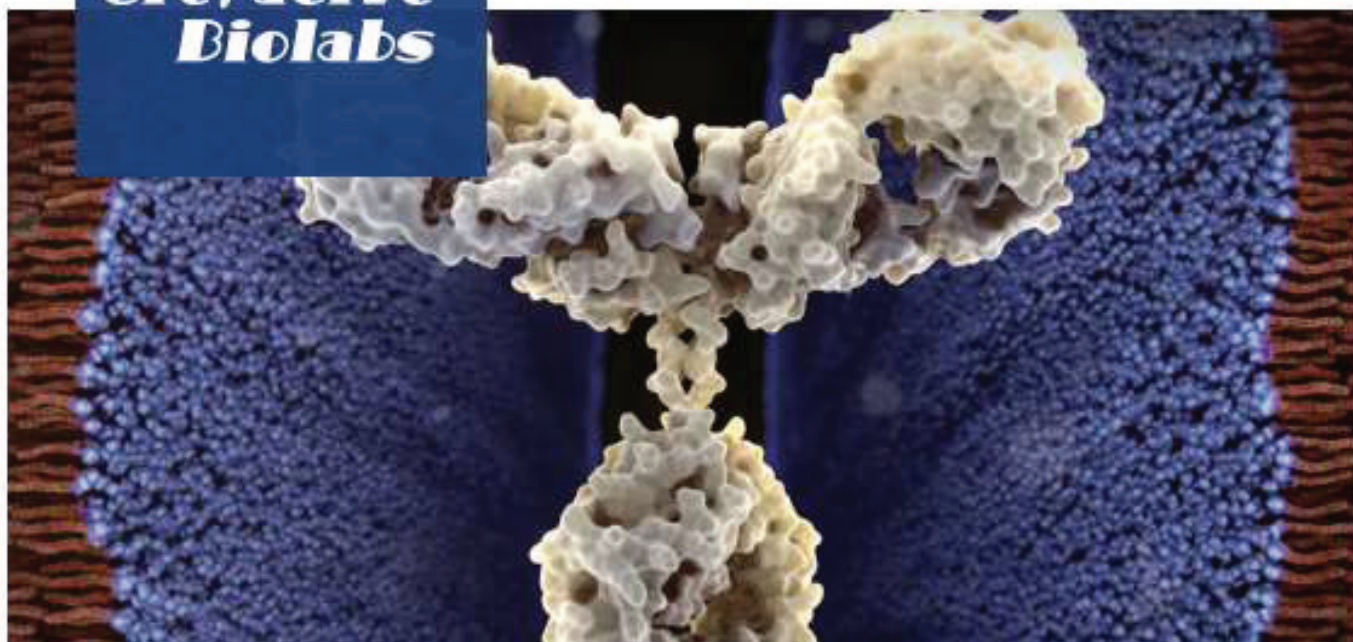
Mathieu, merci pour tant de choses. Ces efforts pour en arriver là où je suis, là où l'on est, c'est avec toi et aussi pour toi. La liberté et la force de poursuivre mes rêves, c'est aussi et surtout toi qui me les donnes.

# ANNEXES

## **Annexe 1 : Essai en double hybride de levure (Société Creative Biolabs)**

The logo for Creative Biolabs, featuring a stylized white leaf-like symbol above the company name. The word "Creative" is in a serif font and "Biolabs" is in a bold sans-serif font, both in white on a dark blue background.

**Creative<sup>®</sup>  
Biolabs**



## **Project Report**

**Project ID: CBLW032218-TY1B-Y2H**

**Date: Jun 15, 2018**

Ping P. Wang, Ph.D.

Creative Biolabs Inc

Tel: 1-631-871-5806, 1-631-381-2994

Email: [pwang@creative-biolabs.com](mailto:pwang@creative-biolabs.com)

45-1 Ramsey Road, Shirley, NY 11967, USA



45-1 Ramsey Road, Shirley, NY 11967, USA

Tel: 1-631-381-2994

Email: [info@creative-biolabs.com](mailto:info@creative-biolabs.com)

## Summary

The client provided the expression plasmids of Hbc, RBMX, and SRSF10 as starting materials. We performed forward and reverse Y2H assays to examine if there is any interaction between Hbc and RBMX or between Hbc and SRSF10.

We first subcloned each gene of interest into bait vector (pGBKT7, Clontech) and prey vector (pGADT7, Clontech), respectively. As shown in Tables 1&2, there were totally 6 plasmids constructed.

We performed the toxicity and self-activation assays of each bait. As shown in Figure 1, there is no toxic effect nor self-activation observed, the bait plasmids were then subjected to the following assay.

In the interaction assays, we co-transformed the bait and prey plasmids into Y2HGold strain and used pGBKT7-53&pGADT7-T as the positive control for interaction, while pGBKT7-lam&pGADT7-T as the negative control. As shown in Figures 2-4, no positive results were observed. The results were summarized in Table 3.

As indicated by the forward and reverse Y2H tests, the protein Hbc has no interaction with protein RBMX or SRSF10.

Figure 3. The results of interaction validation

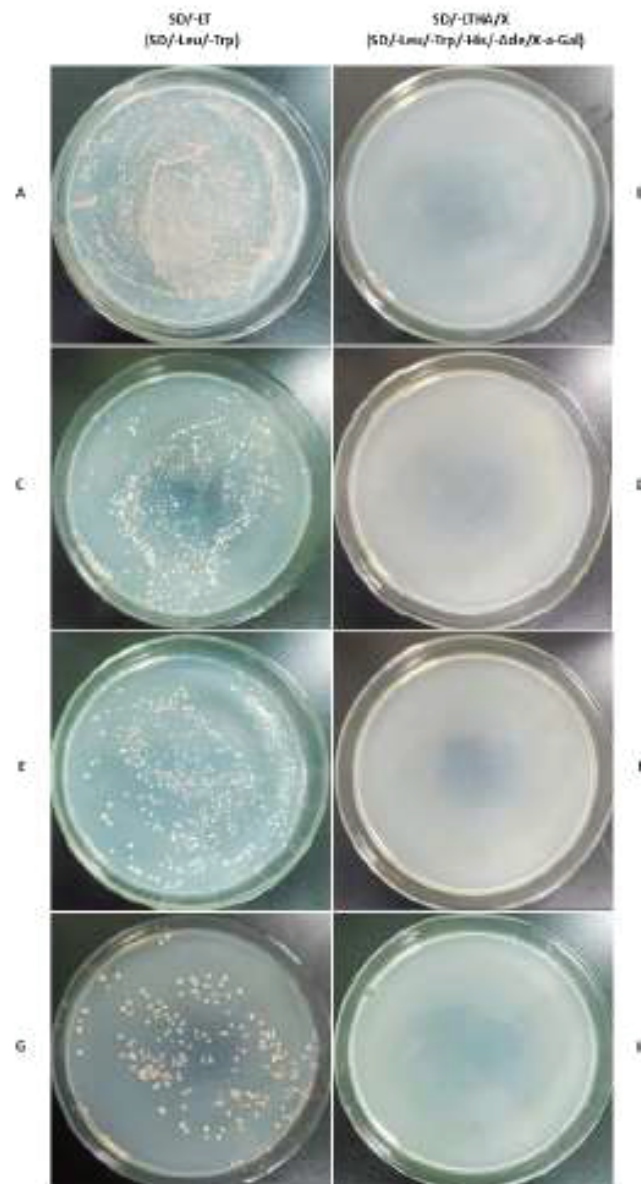


Figure 3. The results of interaction validation. (A-B) pGBKT7-HBc & pGADT7-RBMX, A: normal growth, B: no growth; (C-D) pGBKT7-HBc & pGADT7-SRSF10, C: normal growth, D: no growth; (E-F) pGBKT7-RBMX & pGADT7-HBc, E: normal growth, F: no growth; (G-H) pGBKT7-SRSF10 & pGADT7-HBc, G: normal growth, H: no growth

Figure 4. The speckle pattern of interaction validation



Figure 4. The speckle pattern of interaction validation.

BD stands for GAL4 DNA binding domain; AD stands for GAL4 Activation Domain

Table 3. The results of interaction validation

AD plasmid (prey)	BD plasmid (bait)	Interaction Co-transformed
pGADT7-T	pGBKT7-53	positive
pGADT7-T	pGBKT7-lam	negative
pGADT7-RBMX	pGBKT7-HBc	negative
pGADT7-SRSF10		negative
pGADT7-HBc	pGBKT7-RBMX	negative
	pGBKT7-SRSF10	negative

## **Annexe 2 : Brevet**

### **METHODS FOR TREATING HEPATITIS B VIRUS (HBV) INFECTION**

**Inventeurs :**

**Hélène Chabrolles<sup>1</sup>, Thomas Lahlali<sup>1</sup>, Benoit Chabot<sup>2</sup>, David Grierson<sup>3</sup>, David Durantel<sup>1</sup>, Anna Salvetti<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> INSERM, U1052, Cancer Research Center of Lyon (CRCL), Université de Lyon (UCBL1), CNRS UMR\_5286, Centre Léon Bérard, Lyon, France

<sup>2</sup> Department of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, J1E 4K8, Canada.

<sup>3</sup> Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia V6T 1Z3, Canada



Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

### Acknowledgement of receipt

We hereby acknowledge receipt of your request for grant of a European patent as follows:

Submission number	1000456267	
Application number	EP18305398.2	
File No. to be used for priority declarations	EP18305398	
Date of receipt	04 April 2018	
Your reference	DURANTEL18126AF	
Applicant	INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale)	
Country	FR	
Title	METHODS FOR TREATING HEPATITIS B VIRUS (HBV) INFECTION	
Documents submitted	package-data.xml application-body.xml SPECEPO-1.pdf;Text_18126EP.pdf (23 p.) SEQLTXT.txt;sequence ASCII_18126.ST25.txt	ep-request.xml ep-request.pdf (4 p.) SPECEPO-2.pdf;Drawings_18126.pdf (14 p.) feesheetint.pdf (1 p.)
Submitted by	EMAIL=patents@inserm-transfert.fr,CN=Denise HIRSCH,O=SOCIETE INSERM TRANSFERT,C=FR	
Method of submission	Online	
Date and time receipt generated	04 April 2018, 17:20:37 (CEST)	
Official Digest of Submission	F0:FA:ED:88:B6:EE:68:39:79:E4:EA:78:EC:2B:C8:8A:9D:C6:AC:CD	

/INPI, section dépôt



## **Annexe 3 : Revue Médecine/Sciences**

**Chabrolles H, Lahlali T, Auclair H, Salvetti A.**

Les multiples rôles de la protéine Core du virus de l'hépatite B  
Nouvelles pistes de recherche et enjeux thérapeutiques

**Med Sci MS. 2018 Sep; 34(8-9):693-700**



médecine/sciences 2018 ; 34 : 693-700

► L'infection par le virus de l'hépatite B (HBV) constitue un problème majeur de santé publique avec plus de 250 millions de personnes chroniquement infectées au niveau mondial, qui présentent un risque important d'évolution vers la cirrhose et le cancer du foie. Les traitements disponibles permettent de réduire la réplication virale mais pas d'éliminer le virus. Il est donc primordial de développer de nouvelles thérapies antivirales. Des modulateurs allostériques (ou CAM), qui interfèrent avec les fonctions structurales de Core, la protéine de capsid du virus, sont actuellement en évaluation clinique. L'étude des fonctions régulatrices de la protéine Core pourrait également permettre d'identifier des agents ciblant l'hôte et de développer des thérapies combinées pour un meilleur contrôle de la réplication virale. ◀

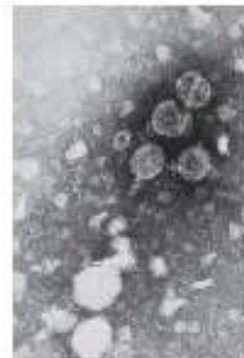
La transmission du virus de l'hépatite B (HBV) s'effectue par contact étroit (voie sanguine, sexuelle, périnatale et salivaire) et conduit à une infection chronique chez environ 90 % des enfants et 10 % des adultes ayant été en contact avec l'HBV, ce qui représente plus de 250 millions de porteurs chroniques dans le monde. Ces derniers présentent un risque très important de développer de graves complications hépatiques, telles qu'une cirrhose et le cancer du foie (carcinome hépatocellulaire ou HCC). La proportion de personnes infectées est particulièrement importante dans certaines régions, notamment d'Asie et d'Afrique subsaharienne [1]. La particule infectieuse d'HBV, ou particule de Dane, mesure environ 42 nm de diamètre (Figure 1A). Elle est composée d'une enveloppe, constituée d'une bicouche lipidique dans laquelle sont enchâssées 3 glycoprotéines virales, à l'intérieur de laquelle se trouve une capsid icosahédrique qui contient le génome viral. Le génome viral est composé d'une molécule d'ADN relâchée circulaire partiellement double brin (ADNrc) de

Wignette (Photos © Centers for Disease Control and Prevention).

## Les multiples rôles de la protéine Core du virus de l'hépatite B

### Nouvelles pistes de recherche et enjeux thérapeutiques

Hélène Chabrolles, Thomas Lahlali, Héroïse Auclair, Anna Salvetti

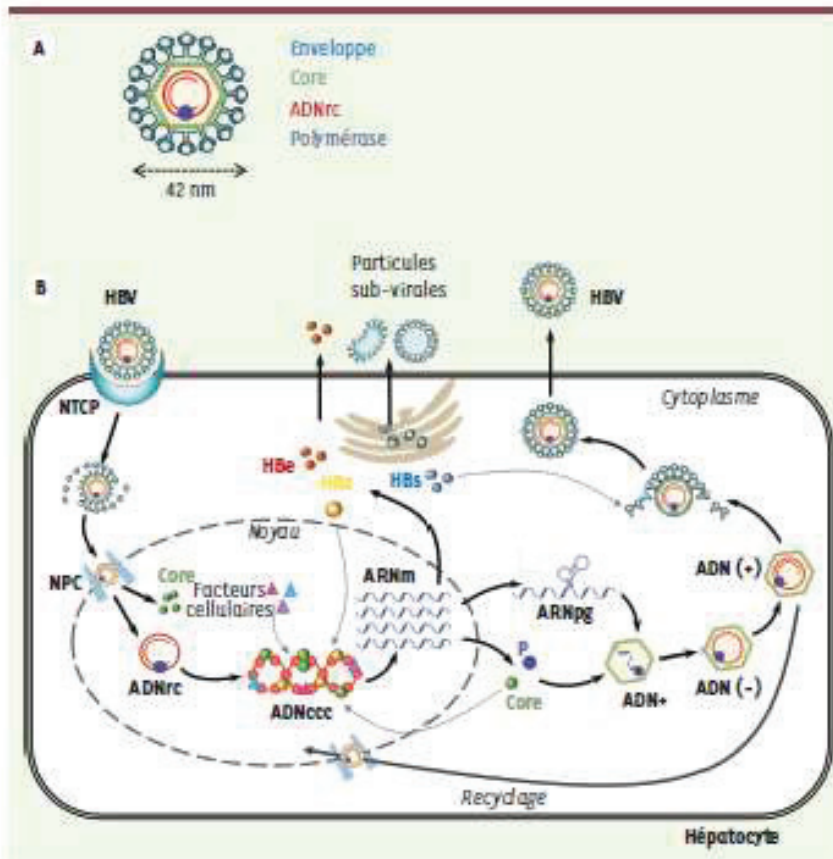


Centre de recherche en cancérologie de Lyon (CRCL), Inserm U1052, 151, cours Albert Thomas, 69003 Lyon, France. [anna.salvetti@inserm.fr](mailto:anna.salvetti@inserm.fr)

3,2 Kb, liée de façon covalente à la polymérase virale (P). Elle comporte 4 cadres de lecture (ORF) chevauchants qui codent 7 protéines virales : les protéines d'enveloppe L, M et S (antigène HBs ou AgHBs), la protéine de capsid Core (ou Hbc), l'antigène HBe (AgHBe), la polymérase virale P, et la protéine HBx [2].

La réplication du virus survient uniquement dans les hépatocytes dans lesquels il pénètre via le transporteur d'acides biliaires NTCP (*sodium taurocholate cotransporting polypeptide*) [3] (Figure 1B). Après son internalisation dans le cytoplasme, la nucléocapsid est transportée vers le noyau où elle se désassemble pour libérer la protéine Core et l'ADNrc. Dans le noyau, l'ADNrc est « réparé » pour former un ADN double brin circulaire clos de façon covalente (l'ADNccc) qui s'associe à des histones et d'autres protéines régulatrices d'origine cellulaire et virale. Ce mini-chromosome viral est responsable de la persistance d'HBV dans les hépatocytes. Il est le support de la transcription virale et permet la synthèse des ARN messagers du virus et de l'ARN pré-génomique (ARNpg) qui est encapsidé avec la polymérase virale dans les capsides en cours d'assemblage dans le cytoplasme de l'hépatocyte. L'ARNpg est ensuite converti en ADNrc (par transcription inverse) par la polymérase virale au sein des capsides néoformées. Les nucléocapsides matures sont alors soit enveloppées et sécrétées afin de permettre la propagation du virus, soit dirigées vers le noyau, pour former de nouvelles molécules d'ADNccc, un phénomène appelé « recyclage » [2].





**Figure 1.** Structure de la particule infectieuse d'HBV et cycle viral. **A.** Structure de la particule de Dane. **B.** Cycle répliatif d'HBV. La répliation d'HBV débute avec l'entrée du virus dans l'hépatocyte par endocytose via le récepteur NTCP (*sodium taurocholate cotransporting polypeptide*). La nucléocapside est libérée dans le cytoplasme et transportée jusqu'aux pores nucléaires (NPC) où elle se désassemble pour libérer l'ADNrc ainsi que la protéine de capsid dans le noyau. L'ADNrc est alors converti en ADNcc qui est chromatinisé par des facteurs cellulaires et viraux (HBe et Core). Ce minichromosome est le support de la transcription virale. Il permet la synthèse des ARNm viraux et de l'ARNpré-génomique (ARNpg) qui est encapsidé avec la polymérase virale (P) par les nouvelles protéines Core produites. La transcription inverse de l'ARNpg en ADNrc se réalise à l'intérieur de la capsid, d'abord avec la formation du brin d'ADN négatif (ADN<sup>-</sup>), puis du brin complémentaire positif (ADN<sup>+</sup>). Les nucléocapsides

néo-synthétisés sont soit recyclés vers le noyau, soit enveloppés et sécrétés. Des particules vides et des antigènes HBs et HBe (particules subvirales) sont aussi sécrétés en même temps que des particules infectieuses.

Chez la majorité des personnes, l'infection aiguë par HBV est asymptomatique et rapidement résolue, grâce à l'induction d'une réponse immunitaire efficace. Une proportion variable de sujets n'élimine cependant pas spontanément le virus. Ils entrent alors dans un stade d'infection chronique, qui progresse sur plusieurs décennies selon plusieurs phases, qui ne sont pas nécessairement successives, de durée variable selon le patient, et qui se distinguent par le niveau de répliation virale (évalué par les taux d'ADN viral et d'antigènes HBe et HBs sériques), l'apparition séquentielle d'anticorps anti-AgHBe puis anti-AgHBs (aussi appelée séroconversion HBe et HBs) et par l'état d'inflammation du foie (mesuré par les transaminases sériques). Succinctement (pour plus de détails, voir [4]), l'évolution des patients infectés de façon chronique par HBV comporte, généralement, une première phase caractérisée par une répliation virale forte et une réponse immunitaire adaptative faible ou indétectable (à l'exception éventuellement d'une réponse humorale anti-HBc). Suivent ensuite des phases au cours desquelles une compétition s'engage entre d'une part, le système immunitaire, avec la mise en place d'une

réponse lymphocytaire de type T CD8 et l'apparition d'anticorps dirigés contre AgHBe, et d'autre part, le virus qui contourne cette réponse, notamment par l'émergence de mutants d'échappement dépourvus d'antigène HBe. Chez la très grande majorité des patients, la réponse immunitaire développée contre les cellules infectées permet de contrôler, au moins de façon transitoire, la répliation virale. Elle ne conduit que rarement à l'élimination complète du virus du foie des patients en raison de la persistance de l'ADNcc dans les cellules et de sa capacité à réactiver la répliation virale. L'émergence d'une réponse immunitaire se traduit également par l'augmentation des transaminases hépatiques, signe d'une nécro-inflammation hépatique, qui accroît le risque de progression vers la fibrose hépatique puis la cirrhose et l'HCC [2, 5].

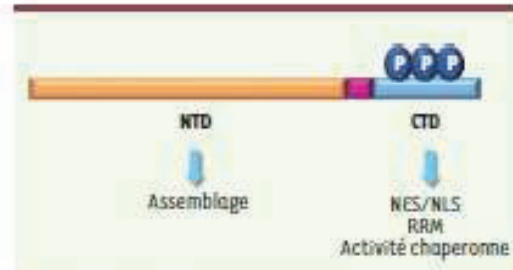
Depuis le début des années 1980, un vaccin prophylactique efficace chez plus de 90 % des sujets vaccinés est

disponible et a permis de réduire l'incidence des infections par HBV dans les pays développés [6]. Cependant, la couverture vaccinale insuffisante dans de nombreuses régions endémiques (en particulier celle des nourrissons nés de mères chroniquement infectées) et le grand nombre de porteurs chroniques, laissent au virus encore de nombreuses décennies de persistance et de propagation, en l'absence de nouvelles stratégies curatives. Les traitements disponibles, à base d'analogues de nucléosides (NUC) et d'interféron- $\alpha$  pégylé (PEG-IFN), permettent de contrôler la réplication virale mais pas d'éliminer l'ADNccc des cellules infectées. Les NUC inhibent la polymérase du virus et donc la synthèse de l'ADN viral au sein des nucléocapsides. Ils réduisent efficacement la charge virale et sont bien tolérés, mais ils doivent être administrés à vie. Le PEG-IFN stimule l'immunité anti-HBV. Il agit également sur d'autres étapes du cycle viral, notamment en diminuant l'activité transcriptionnelle du génome du virus. Il est administré pour une durée limitée, et peut parfois conduire à une séroconversion AgHBs. Le PEG-IFN n'est efficace que chez 25 % des patients éligibles à ce traitement (en fonction de la phase de la maladie, des génotypes viraux, etc.), et il est souvent mal toléré [7]. Le développement de nouvelles thérapies anti-HBV est donc primordial. De par son rôle structural majeur, la protéine Core représente une cible de choix pour le développement de nouvelles molécules à activité antivirale. Des données récentes indiquent qu'au-delà de son activité structurale, Core posséderait également des fonctions régulatrices importantes dans la réplication virale et le devenir de l'hépatocyte. L'étude de ces fonctions paraît donc déterminante, non seulement pour mieux comprendre le mode d'action des traitements existants, mais aussi pour développer de nouvelles molécules capables d'interférer spécifiquement avec les fonctions régulatrices de Core.

### Rôle de Core dans la formation et le devenir des capsides virales

La protéine Core qui correspond à l'unité structurale de la capside, est composée de 183 à 185 acides aminés (aa) selon le génotype d'HBV. Cette protéine est constituée de deux domaines fonctionnels distincts séparés par une courte région charnière (Figure 2). Le domaine N-terminal (NTD : aa 1 à 140) est essentiel pour l'assemblage des capsides et pour leur enveloppement [8]. Le domaine C-terminal (CTD : aa 151 à 183/185), riche en arginines et en sérines, n'est pas essentiel pour l'assemblage des capsides, mais présente différentes régions régulatrices [9]. La petite région charnière (ou *linker* : aa 141 à 150), qui sépare le NTD du CTD, pourrait aussi intervenir lors de l'étape d'encapsidation de l'ARNpg [10]. Les séquences de localisation (NLS [*nuclear localization signal*]) et d'export (NES [*nuclear export signal*]) nucléaires présentes dans le CTD de Core, permettent les transferts de la protéine entre le cytoplasme, lieu d'assemblage des capsides, et le noyau de la cellule. L'ensemble des fonctions de Core sont régulées par des modifications post-traductionnelles, en particulier des phosphorylations, au niveau des résidus sérine du CTD [11].

Lors de la formation de capsides, la protéine Core s'assemble spontanément en dimères, puis en multimères et, enfin, en capsides icosahé-



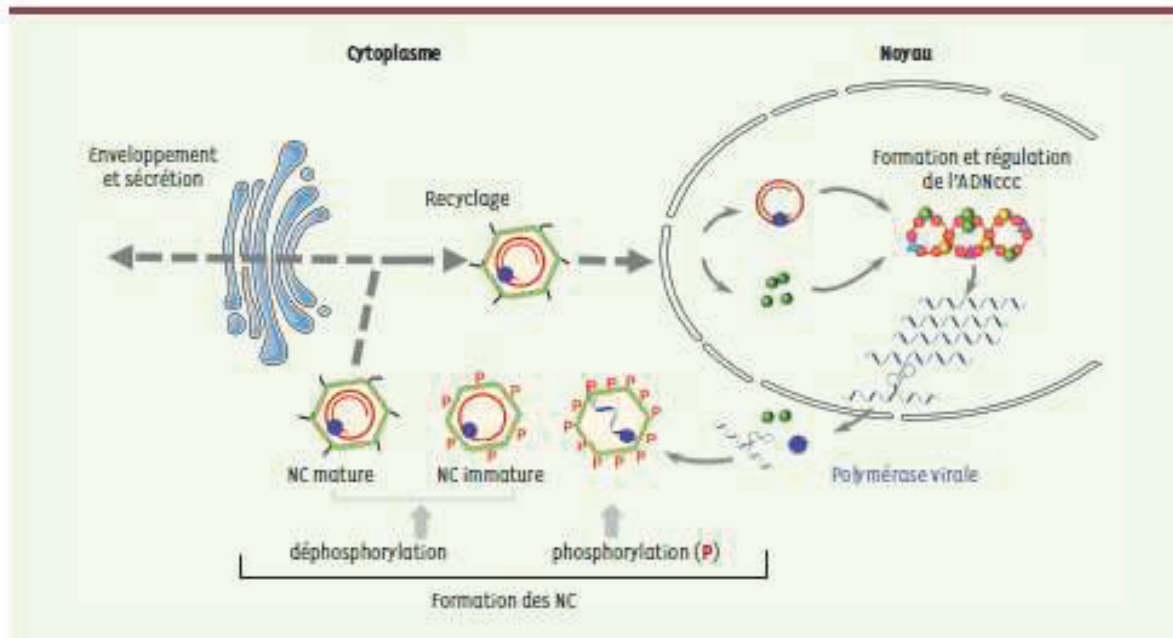
**Figure 2.** Domaines fonctionnels de la protéine Core. La protéine Core est composée de trois domaines : le domaine N-terminal (NTD), qui intervient dans l'assemblage de Core en dimères et multimères ; le domaine charnière (en violet) fait le lien avec le domaine C-terminal (CTD) responsable des fonctions régulatrices de Core. Le CTD est riche en arginines et en sérines (pouvant être phosphorylées P), notamment lors de l'assemblage de la capside) et présente un motif de reconnaissance des ARN (RRM). Il présente aussi des séquences de localisation - NLS (*nuclear localization signal*) - et d'export - NES (*nuclear export signal*) nucléaire qui lui permettent de faire la navette entre noyau et cytoplasme. Le CTD confère aussi à Core ses propriétés de chaperonne d'acides nucléiques.

driques [8]. L'ARNpg, qui doit s'associer à la polymérase virale pour que l'encapsidation soit initiée, interagit avec le domaine CTD hyperphosphorylé de Core. L'activité chaperonne d'acides nucléiques de Core permet de maintenir un bon repliement de l'ARNpg et sa transcription inverse en ADNrc [11] (Figure 3).

### Régulation des fonctions de Core par son degré de phosphorylation

L'hyperphosphorylation de Core est donc associée à l'étape d'encapsidation de l'ARNpg à l'origine de la formation de nucléocapsides immatures. Par la suite, parallèlement à la transcription inverse de l'ARNpg en ADNrc, le CTD de Core est déphosphorylé et externalisé à la surface de la capside. Il devient alors accessible pour interagir avec des protéines cellulaires, dont celles impliquées dans le trafic intracellulaire. Ces nucléocapsides devenues matures interagissent avec les protéines d'enveloppe virale, pour être enveloppées et secrétées, ou avec les protéines des pores nucléaires (NPC), pour être recyclées vers le noyau de la cellule [11] (Figure 3). Les phosphatases qui déphosphorylent le CTD de Core lors de la maturation des capsides et de la transcription inverse n'ont pas encore été identifiées. Les kinases qui participent à sa phosphorylation restent également mal définies et font encore l'objet de controverses. Un rôle a été montré pour les protéines kinases A et C (PKA/Akt, PKC), ainsi que pour les kinases dépendant des cyclines





**Figure 3.** Formation et devenir des nucléocapsides d'HBV. Dans le noyau, la protéine Core et des facteurs de l'hôte se fixent sur l'ADNccc et régulent sa transcription. Parmi les 5 ARNm transcrits, seul l'ARNpg, associé à la polymérase virale, est encapsidé. Les nucléocapsides (NC) immatures ainsi formées sont hyperphosphorylées. Elles sont ensuite déphosphorylées, parallèlement à la transcription inverse de l'ARNpg en ADNrc, produisant les capsides matures. Celles-ci peuvent être enveloppées puis sécrétées, ou recyclées vers le noyau et alimenter le « pool » d'ADNccc.

1 et 2 (cdk1,2). Des kinases de protéines SR (SRPK [SR protein-specific kinases]), qui contrôlent l'épissage des ARNm, ont été aussi impliquées dans la phosphorylation de Core [11]. Étant donné l'homologie qui existe entre le CTD de Core et le domaine riche en sérines et arginines des protéines SR [12], il n'est pas surprenant que Core puisse être phosphorylée par les kinases SRPK1 et 2. Récemment, notre équipe a montré que Core était également un substrat de la *Polo kinase-1* (PLK1), qui intervient dans le contrôle du cycle cellulaire et est surexprimée dans certains cancers, notamment ceux induit par HBV [13].

### Interaction de Core avec le noyau cellulaire

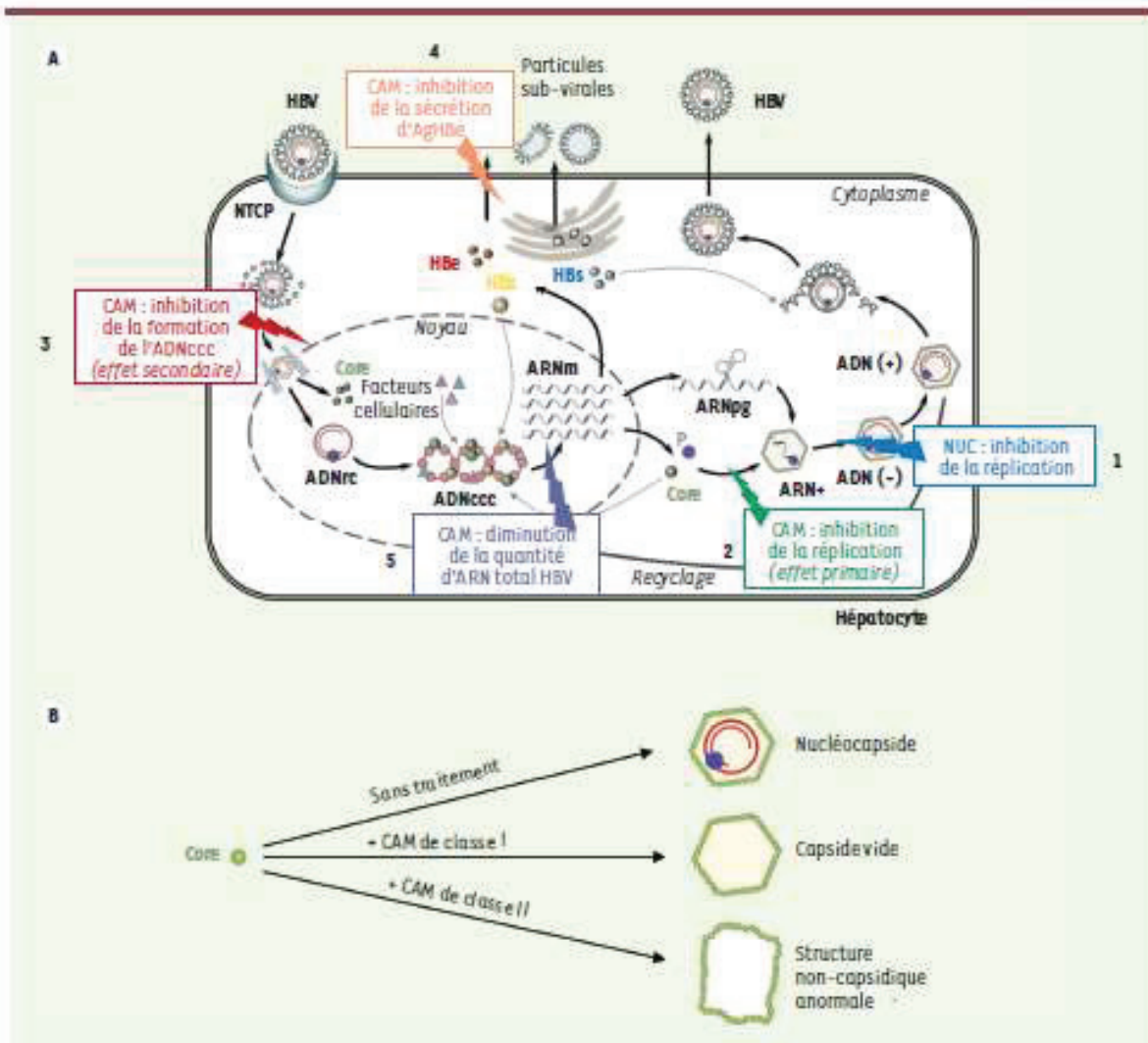
La séquence de localisation nucléaire (NLS) du CTD de Core permet l'adressage des nucléocapsides d'HBV présentes dans le cytoplasme de la cellule après l'étape d'entrée ou après assemblage du virus vers la membrane nucléaire. Deux modèles décrivant la localisation exacte du désassemblage de la capside ont été proposés. Dans le premier modèle, la capside se désassemblerait dans le cytoplasme, à proximité du pore nucléaire, et libérerait l'ADNrc alors rapidement pris en charge par les importines pour traverser la membrane nucléaire. Le deuxième modèle prévoit qu'après liaison de la capside aux importines, en particulier l'importine  $\beta$ , le complexe se lierait à la nucléoporine Nup153, un des constituants du pore nucléaire. Le désassemblage surviendrait, dans ce cas, dans le panier nucléaire, qui se trouve sur la face interne de la membrane nucléaire, et conduirait à la libération, dans le nucléoplasme,

de l'ADNrc lié à la polymérase et de dimères de Core [14]. Ce deuxième modèle pourrait expliquer la très faible réponse immunitaire innée provoquée par l'infection par HBV, du fait de l'absence d'exposition du génome viral aux récepteurs senseurs d'acides nucléiques présents dans le cytoplasme [15].

Dans des hépatocytes infectés en culture ou *in vivo*, la protéine Core présente fréquemment une localisation nucléaire. Ceci suggère qu'elle pourrait s'accumuler dans ce compartiment cellulaire, indépendamment de la formation de nucléocapsides, en particulier lorsque le virus se réplique activement [16]. La présence de Core est aussi observée dans le noyau d'hépatocytes qui expriment la protéine en l'absence des autres constituants viraux. Ces observations ont conduit plusieurs groupes à s'intéresser aux fonctions nucléaires de Core lors de l'établissement de l'infection par HBV.

### Fonctions nucléaires de Core

Des études réalisées dans des hépatocytes *in vitro* ont montré que très rapidement après l'infection des cellules par HBV, la protéine Core, ainsi que des protéines cellulaires, se fixent à l'ADNccc nouvellement formé pour participer à la formation du minichromosome viral



**Figure 4.** Effet des analogues de nucléosides (NUC) et des cam protéin allosteric modulators (CAM) sur le cycle répliatif d'HBV. A. Effet des NUC et des CAM sur le cycle viral d'HBV. Contrairement aux NUC (Tenofovir, par exemple) qui inhibent uniquement la répllication virale en empêchant la transcription inverse de l'ARNpg en ADNrc (1), les CAM peuvent interférer avec plusieurs étapes du cycle viral. En effet, ils inhibent la répllication virale en accélérant la cinétique de formation de la capsidie virale, ce qui conduit à la génération de capsides vides (2) (effet primaire) et peuvent aussi inhiber la formation de novo de l'ADNccc en agissant à une étape post-entrée (3) (effet secondaire). Plus récemment, il a été montré que les CAM peuvent inhiber la sécrétion d'AgHBe (4) et diminuer la quantité d'ARN viral intracellulaire (5). B. Effet des CAM sur l'assemblage des capsides d'HBV. Les CAM de classe-I (Phénylpropénamides, PPA, ou sulfamoylbenzamide) induisent la formation de capsides de structure normale mais dépourvues du génome viral tandis que les CAM de classe-II (hétéroarypyrimidine, HAP) induisent la formation de structures anormales également dépourvues du génome viral.

(Figure 3). En particulier, Core se lie aux îlots CpG de l'ADNccc et module l'espace des nucléosomes [17]. Sa présence a également été corrélée à un état de transcription actif de l'ADNccc [18]. La réduction des formes monomériques et dimériques de Core induit une diminution de sa liaison à l'ADNccc et de la production des ARN et des protéines d'HBV [19]. Récemment, il a été montré que l'arginine méthyltransférase 5 (PRMT5) exerce un effet négatif sur la transcription virale, en

induisant des modifications épigénétiques répressives et en inhibant l'encapsidation de l'ARNpg [20]. PRMT5 interagit avec Core : elle régulerait ses fonctions et sa localisation en provoquant des modifications post-traductionnelles [21]. L'ensemble de ces études indiquent que Core jouerait un rôle important dans la régulation de la transcription virale.

Molécule	Développeur	Étape de développement	Patients	Identifiant sur ClinicalTrials.gov
NVR3-778	Novira Therapeutics-Janssen	Phase I terminée	Sains et porteurs chroniques d'HBV	NCT02112799 NCT02401737 NCT03032536
JNJ-54136379	Janssen	Phase 2a	Sains et porteurs chroniques d'HBV	NCT03361956 NCT03111511 NCT02662712 NCT02933580
ABI-140731	Assembly Biosciences	Phase 2a	Porteurs chroniques d'HBV	NCT02908191 NCT03109730 NCT03576066 NCT03577171
GLS-4	HEC Pharma/Sunshine	Phase 2/3	Sains et porteurs chroniques d'HBV	CFDA (pharmacodia.com)
RO7049387	Roche	Phase I	Sains et porteurs chroniques d'HBV	NCT02972255 NCT02952924 NCT03570658

Tableau 1. Les *core protein* allosteric modulators (CAM) en essai clinique. CFDA : China food and drug administration.

La protéine Core a été aussi impliquée dans la régulation de certaines fonctions cellulaires, en agissant au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel. Elle se lie en effet aux promoteurs de nombreux gènes cellulaires (par exemple ceux activés en réponse à l'interféron) et pourrait inhiber leur expression [22]. Core interagit aussi avec les facteurs cellulaires E2F1 (facteur de transcription) et DR5 (ou TRAIL[*TNF-related apoptosis-inducing ligand*]-R2, un « récepteur de mort » impliqué dans l'apoptose) et inhibe leur fonction [23, 24]. Core perturbe également le métabolisme des ARNm en mobilisant le complexe de transcription et d'export des ARNm TREX (*transcription ARNm export complexe*). En particulier, Core interagit avec les facteurs d'export des ARN, NXF1-p15 (*nuclear RNA export factor 1*) et TREX, via sa région NES (*nuclear export signal*), présents dans son CTD, qui se fixe également aux ARNm viraux et à l'ARNpg [25]. Cette interaction permettrait l'export de Core, peut-être sous la forme d'un complexe ribonucléoprotéique vers le cytoplasme. Il est donc possible que, par son domaine CTD qui présente des homologies avec un domaine présent dans les protéines SR, la protéine Core joue un rôle dans le devenir des ARN viraux et/ou cellulaires. L'ensemble de ces fonctions régulatrices expliquerait la présence de Core dans le noyau des hépatocytes infectés par HBV.

Plusieurs questions restent sans réponse, notamment celle concernant la forme active de Core dans le noyau. Après le désassemblage de la capsid, Core pénétrerait dans le noyau sous la forme de dimères, qui pourraient se réassembler en capsides dépourvues de génome, lorsque leur quantité atteindrait un certain seuil [26]. Des intermédiaires, constitués de trimères de dimères, pourraient aussi être retrouvés [8]. Cependant, l'important encombrement stérique des capsides, et/ou des trimères de dimères, pourrait être défavorable à de telles interactions. Le mécanisme de liaison de Core aux acides nucléiques reste également à comprendre. La protéine Core possède une activité chaperonne

d'acides nucléiques : elle est capable de catalyser des modifications conformationnelles et structurales des acides nucléiques *in vitro* [9]. Cette propriété est conférée par la région riche en arginines de son CTD [27]. Il est donc probable que ce soit également ce domaine qui confère à Core la capacité de se lier au minichromosome viral, mais aussi à quelques 3 100 promoteurs de gènes humains dans des hépatocytes infectés par HBV [22].

### Enjeux thérapeutiques

Par son rôle essentiel dans la formation des capsides du virus, Core a rapidement été considérée comme une cible prometteuse pour le développement de nouvelles molécules antivirales. Les études de sa structure ont permis l'émergence d'une nouvelle génération d'antiviraux ciblant cette protéine, désignés *Core protein allosteric modulators* (ou CAM), qui sont actuellement en phase d'évaluation préclinique et clinique. Ces molécules perturbent la formation de la capsid virale, empêchant l'encapsidation de l'ARNpg, ce qui conduit à une inhibition de la réplication virale (effet primaire des CAM, *Figure 4A*) [28, 29]. On distingue deux classes de CAM : les CAM de classe I (phénylpropénamide ou PPA, et sulfamoylbenzamide) qui accélèrent fortement le processus d'assemblage produisant la formation de capsides de structure normale mais vides, dépourvues d'ARNpg ; les CAM de classe II (hétéroarylpyrimidine, ou HAP) qui conduisent à la formation de structures anormales (*Figure 4B*) [8]. Lorsque présents au moment



de l'infection, les CAM pourraient également inhiber la formation de l'ADNccc (effet secondaire des CAM, *Figure 4A*). La fixation des CAM sur la capsid virale serait à l'origine de sa déformation, ce qui conduirait à la libération de l'ADNrc dans le cytoplasme et à sa dégradation [30]. Elle pourrait aussi induire le blocage du désassemblage des capsides, empêchant la libération de l'ADNrc dans le noyau.

Des essais cliniques de phase I à III sont en cours actuellement, impliquant de nombreux CAM comme NVR 3-778 (NCT02112799 ; *Novira Therapeutics*), ABI-H0731 (NCT02908191 ; *Assembly Biosciences*), JN-56136379 (NCT02662712 ; *Janssen*), GLS-4 (*Morphothiadine Mélysate, HEC Pharm<sup>1</sup>*), et R07049389 (NCT02952924 ; *Roche*) (*Tableau 1*). De nombreux autres CAM sont en phase d'évaluation préclinique, comme A8506 (*Arbutus*).

Les CAM pourraient, en plus de leurs effets sur l'assemblage et/ou le désassemblage de la capsid, interférer avec les fonctions régulatrices nucléaires de Core, comme la régulation de la transcription de l'ADNccc et l'expression de gènes cellulaires (*Figure 4A*). Comme cela a été décrit récemment pour l'hétéroaryldihydropyrimidine (Bay 38-7690) [31], nous avons observé qu'un traitement par les CAM entraîne une relocalisation rapide de Core dans des focus nucléaires situés à proximité des corps PML (*promyelocytic leukemia body*), des structures subnucléaires associées aux réponses intrinsèques antivirales<sup>2</sup>. Ces focus de Core sont également localisés à proximité des composants du protéasome nucléaire, suggérant que Core pourrait subir des modifications post-traductionnelles (comme une ubiquitination) qui conduiraient à sa dégradation. Cette relocalisation de Core en réponse au traitement par les CAM, pourrait expliquer la réduction du niveau d'ARN viraux qui est observée dans ces conditions [32]. Les CAM pourraient également inhiber la sécrétion d'AgHBe<sup>3</sup>. Le mécanisme moléculaire mis en jeu reste cependant à élucider. Néanmoins, le précurseur d'AgHBe possède la même séquence primaire que la protéine Core, avec 21 aa supplémentaires en position N-terminale. Les CAM pourraient donc, comme Core, induire l'agrégation du précurseur d'AgHBe dans le cytoplasme de la cellule et inhiber sa sécrétion.

Bien qu'initialement développés pour contrer la formation des nucléocapsides virales, les CAM s'avèrent donc, en inhibant les fonctions régulatrices nucléaires de Core, capables d'interférer avec de nombreuses autres étapes du cycle du virus. L'étude des fonctions de Core devrait permettre d'approfondir les connaissances sur les mécanismes d'action des CAM et ainsi de mieux discriminer les molécules selon leur(s) activité(s). Les essais cliniques qui sont en cours devraient, eux, conduire à la détermination de la durée de traitement nécessaire à la suppression de la réplication virale, de savoir si l'arrêt du traitement s'accompagne de phénomènes de rebond, et de mettre en évidence de possibles effets indésirables à long terme.

L'objectif idéal des recherches actuelles sur des nouvelles molécules antivirales telles que les CAM serait de concevoir des traitements permettant une cure complète de l'infection chronique par HBV, c'est-à-dire l'élimination du virus (en particulier de son ADNccc) de la totalité des cellules hépatiques infectées. La capacité de l'ADNccc à persister dans les hépatocytes infectés, même en l'absence de réplication détectable, et ce pendant de longues périodes de temps, rend cet objectif difficilement atteignable. C'est pourquoi, scientifiques et médecins s'accordent pour qu'un premier objectif, plus réaliste, consiste en l'obtention d'une cure fonctionnelle, c'est-à-dire une absence durable de détection d'AgHBs dans le sérum des patients, et donc de réplication virale dans les cellules, avec ou sans séroconversion anti-HBs, et cela malgré la persistance d'ADNccc.

Combiner les CAM aux NUC (le Tenofovir, par exemple) et/ou à des molécules immunomodulatrices capables d'induire une réponse immunitaire efficace pourrait être une option thérapeutique prometteuse pour conduire à une cure fonctionnelle. Des traitements pourraient également être des combinaisons de thérapies avec de nouvelles molécules ciblant des partenaires cellulaires de Core, appelés *agents ciblant l'hôte* (ou HTA pour *host targeting agents*). Ainsi, l'infection par HBV est associée à une augmentation de l'expression et de l'activation de la kinase cellulaire PLK1, et le BI-2536, un inhibiteur spécifique de l'activité de PLK1, inhibe la réplication virale [13]. L'identification des partenaires nucléaires de Core, actuellement en cours dans notre laboratoire, devrait donc permettre d'identifier de nouveaux HTA et de les cibler, ce qui représente une option thérapeutique prometteuse pour développer des thérapies combinées pouvant améliorer le contrôle de la réplication virale. ♦

## SUMMARY


**The multiple functions of the hepatitis B virus core protein: new research directions and therapeutic challenges**  
Chronic infection by hepatitis B virus (HBV) is a major public health problem with more than 250 millions of people chronically infected worldwide who have a high risk to develop cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Available treatments reduce viremia but do not eradicate the virus from hepatocytes. Therefore, there is an urgent need to develop new classes of antiviral molecules and the viral capsid protein, Core, constitutes a new favored target. Core protein Allosteric Modulators (CAMs) targeting its assembly functions are in clinical development. In addition, investigation of Core regulatory functions may lead to the develop-

<sup>1</sup> Essai en cours avec la CFDA (*China food and drug administration*).

<sup>2</sup> Jeongdar P, Lam AM, Han S, et al. HBV core assembly modulators induce nuclear relocalization of HBV core in persistently infected HepoRG cells. *International HBV Meeting*. Seoul, Corée du sud. 21-24 septembre 2014.

<sup>3</sup> Yan J, Gao L, Tang J, et al. A novel core allosteric modulator reduces HBsAg through induction of its precursor misassembly. *International HBV Meeting*. Washington DC, USA. 3-7 septembre 2017.



ment of compounds targeting cellular factors (HTA) that could be used in combined therapies aiming to achieve a better control of HBV replication. 

#### LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

#### RÉFÉRENCES

- Petrusziello A. Epidemiology of hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) related hepatocellular carcinoma. *Open Virol J* 2018; 12: 24-32.
- Seeger C, Mason HS. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Microbiol Rev* 2015; 479-489: 472-84.
- Yan H, Zheng G, Xu G, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* 2012; 3.
- European Association for the Study of the Liver. Electronic address, European association for the study of the liver. EASL 2017 Clinical practice guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2017; 67: 578-98.
- Chiori FV, Isegawa M, Wieland SF. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Pathol Res (Paris)* 2018; 58: 258-66.
- Chang MH, Chen DS. Prevention of hepatitis B. *Cold Spring Harbor Perspect Med* 2015; 5: e001493.
- Rijckborst V, Jonsson HL. The role of interferon in hepatitis B therapy. *Curr Hepat Rep* 2018; 9: 251-8.
- Zlotnick A, Venkateshkrishnan B, Tan Z, et al. Core protein: a pleiotropic keystone in the HBV life cycle. *Antiviral Res* 2015; 121: 82-93.
- Chen TH, Liu AT, Se PY, et al. Nucleic acid chaperone activity associated with the arginine-rich domain of human hepatitis B virus core protein. *J Virol* 2014; 88: 2538-43.
- Watts NR, Cornway J, Cheng N, et al. The morphogenic linker peptide of HBV capsid protein forms a mobile trap on the interior surface. *EMBO J* 2002; 21: 876-84.
- Diab A, Foca A, Zoulim F, et al. The diverse functions of the hepatitis B core/capsid protein (HBC) in the viral life cycle: Implications for the development of HBC-targeting antivirals. *Antiviral Res* 2018; 149: 211-20.
- Rizzo R, Rendic D. Hepatitis B virus and Homo sapiens proteome-wide analysis: a profusion of viral peptide overlaps in neuron-specific human proteins. *Bioinformatics* 2018; 4: 75-81.
- Diab A, Foca A, Fasil F, et al. Polio-like-kinase 1 is a proviral host factor for hepatitis B virus replication. *Appl biology* 2017; 44: 1750-65.
- Gallucci I, Mann M. Nuclear import of hepatitis B virus capsids and genome. *Viruses* 2017; 9.
- Faura-Dupey S, Lucifora J, Duranini D. Interplay between the hepatitis B virus and innate immunity: from an understanding to the development of therapeutic concepts. *Viruses* 2017; 9.
- Zhang X, Lu W, Zheng Y, et al. In situ analysis of intrahepatic virological events in chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Invest* 2014; 124: 1079-92.
- Bock CT, Schwinn S, Lecarmain S, et al. Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome. *J Mol Biol* 2001; 307: 185-96.
- Guo YH, Li YN, Zhao JR, et al. Hbc binds to the CpG islands of HBV cccDNA and promotes an epigenetic permissive state. *Epigenetics* 2011; 4: 720-6.
- Belloni L, Li L, Palumbo GA, et al. HBV's hepatitis B virus (HBV) capsid inhibitors block core protein interaction with the viral minichromosome and host cell genes and affect cccDNA transcription and stability. *Hepato* 2013; 58: 277A.
- Zhang W, Chen J, Wu M, et al. PRMT5 restricts hepatitis B virus replication through epigenetic repression of covalently closed circular DNA transcription and interference with pregenomic RNA encapsidation. *Hepatology* 2017; 64: 398-415.
- Lubyova E, Hodak J, Zabransky A, et al. PRMT5: a novel regulator of Hepatitis B virus replication and an arginine methylase of HBV core. *PLoS One* 2017; 12: e0184982.
- Guo Y, Kang W, Lai X, et al. Hepatitis B viral core protein disrupts human host gene expression by binding to promoter regions.  *BMC Genomics* 2012; 13: 563.
- Kwon JA, Rho HM. Transcriptional repression of the human p53 gene by hepatitis B viral core protein (HBC) in human liver cells. *Biochem Chem* 2003; 384: 205-12.
- Du J, Liang X, Liu Y, et al. Hepatitis B virus core protein inhibits TRAIL-induced apoptosis of hepatocytes by blocking DR5 expression. *Clin Death Disfunct* 2009; 14: 219-29.
- Yang CC, Huang BY, Li HC, et al. Nuclear export of human hepatitis B virus core protein and pregenomic RNA depends on the cellular MXP1-p15 machinery. *PLoS One* 2014; 9: e106483.
- Rabe R, Delecloux M, Bischof A, et al. Nuclear entry of hepatitis B virus capsids involves disintegration to protein dimers followed by nuclear reassociation to capsids. *PLoS Pathog* 2009; 5: e0000543.
- Kasael M. The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly. *J Virol* 1992; 66: 4107-16.
- Wang XY, Wei ZH, Wu QF, et al. In vitro inhibition of HBV replication by a novel compound, GL54, and its efficacy against interferon- $\alpha$ 2a-resistant HBV mutations. *Antiviral Ther* 2012; 17: 793-803.
- Beuma T, Lee S, Venkatesh B, et al. Small-molecule effectors of hepatitis B virus capsid assembly give insight into virus life cycle. *J Virol* 2008; 82: 10267-78.
- Guo F, Zhao Q, Sherrill M, et al. HBV core protein silencing modulators differentially alter cccDNA biosynthesis from de novo infection and intracellular amplification pathways. *PLoS Pathog* 2017; 13: e0006458.
- Huber AD, Wolf JJ, Liu D, et al. The heterozygosity drop-in modulator bar-38-7498 induces hepatitis B virus core protein aggregates associated with promyelocytic leukemia nuclear bodies in infected cells. *mSphere* 2018; 3.
- Lahiani T, Berke JM, Vengasani K, et al. Novel potent capsid assembly modulators regulate multiple steps of the hepatitis B virus life cycle. *Anticancer Agents Chemother* 2018 Jul 14. pii: AAC.00835-18. doi: 10.1126/AAC.00835-18.

TIRÉS À PART  
A. Salvetti

Retrouvez toutes les Actualités de la Myologie sur les sites de :

la Société Française de Myologie  
[www.sfmmyologie.org](http://www.sfmmyologie.org)



la filière de santé neuromusculaire FILNEMUS  
[www.filmemus.fr](http://www.filmemus.fr)





**Tarifs d'abonnement m/s - 2018**

**Abonnez-vous**

**à médecine/sciences**

> Grâce à m/s, vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

**Bulletin d'abonnement**

**page 754 dans ce numéro de m/s**

