



HAL
open science

Approches "perte de fonction" pour l'étude des interactions hôte-virus dans le cas des hépatites virales chroniques

Vincent Turon-Lagot

► **To cite this version:**

Vincent Turon-Lagot. Approches "perte de fonction" pour l'étude des interactions hôte-virus dans le cas des hépatites virales chroniques. Virologie. Université de Strasbourg, 2020. Français. NNT : 2020STRAJ068 . tel-03543191

HAL Id: tel-03543191

<https://theses.hal.science/tel-03543191v1>

Submitted on 25 Jan 2022

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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ (414)

Institut de recherche sur les maladies virales et hépatiques

THÈSE présentée par :

Vincent TURON-LAGOT

Soutenue le : **25 septembre 2020**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/Spécialité : **Virologie – Aspects moléculaires et médicaux**

**Approches perte-de-fonction pour l'étude des interactions
hôte-virus dans le cas des hépatites virales chroniques**

THÈSE dirigée par :

Dr Schuster Catherine

Inserm (U1110), Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr Imbert Isabelle

Dr Parent Romain

CNRS (UMR7257), Université Aix-Marseille

Centre de recherche en cancérologie de Lyon

EXAMINATEUR INTERNE :

Prof Dimitrova Maria

CNRS (UPR2357), Université de Strasbourg

*« Il existe peut-être un autre moyen de savoir. C'est de
renoncer à connaître, et de chercher à comprendre »*

René Barjavel

Remerciements

Premièrement, je souhaite remercier les membres de mon jury de thèse **Maria Dimitrova, Isabelle Imbert** et **Romain Parent** d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Je souhaite tout particulièrement remercier **Catherine Schuster**, ma directrice de thèse, de m'avoir pris sous son aile pendant ces quatre dernières années. Merci pour la confiance que tu m'as accordée. Ton écoute, ta curiosité scientifique et ta détermination m'ont permis de m'épanouir durant mon doctorat et de grandir humainement et scientifiquement. Cette aventure n'aurait pas pu être possible sans ton soutien infaillible.

Je tiens également à remercier **Éloi Verrier** de m'avoir accueilli dans son groupe durant mes deux dernières années de doctorat. J'ai énormément appris à tes côtés et j'ai eu un vrai plaisir à découvrir le monde de l'hépatite D grâce à toi.

L'équipe HBV/HDV peut également compter sur une technicienne et une assistante ingénieur de choc, **Charlotte** et **Laura**. Vos compétences et votre rigueur ont fait de moi un meilleur scientifique. Votre force et votre bonne humeur constante ont également été un moteur pendant ces quatre dernières années. Merci à vous.

Je remercie tous les membres passés et présents de l'unité Inserm U1110. Évoluer dans un environnement aussi divers est une vraie chance. J'ai passé quatre années formidables principalement grâce à vous. Que ce soit pour un café, les beer time et tous les moments passés dans et en dehors du labo, ce doctorat n'aurait pas été le même sans vous.

Les amis ce sont la famille que l'on choisit et j'ai la chance de compter dans cette famille **Emma, Paula** et **Arnaud**. Nous avons commencé cette aventure ensemble sans savoir où elle allait nous mener. Après plusieurs voyages aux quatre coins de l'Europe et des apéros innombrables, nous voilà tous sur le point d'être docteur.

Emma, merci d'avoir dit oui à presque toutes mes idées les plus folles, d'être ma partenaire de karaoké même si ta voix est pratiquement muette, de m'avoir hébergé lors de mes AirBnB. Un jour on la fera cette rando de 30 km ensemble.

Paula, merci d'être notre rayon de soleil qui fait oublier les journées difficiles, de demander Shakira quand on doit danser, de vouloir prendre une glace même quand on n'a pas le temps. Nous aurons maintenant le temps de finir tous les repas et surtout les soirées aussi tard qu'on le souhaite.

Arnaud, merci de m'avoir appris tous les chants du RCS (j'en ferai des cover), de nous avoir fait découvrir des (tes) gins incroyables, de perdre tes voyelles quand l'heure est lointaine. Qui sait, j'irai peut-être à la Meinau avec toi porter fièrement le bleu et blanc.

Nico Bev, Dr Estelle, Max et Ju, merci d'être entrés dans ma vie durant ces années, tous ces moments passés ensemble ont été précieux.

À tout le **groupe de la bière**, merci d'avoir accepté de faire les apéros le jeudi, puis le lundi, puis le mardi, puis le mercredi. Le rendez-vous n'a (presque jamais) été manqué et ces années auraient été tellement plus difficile sans vous. Merci pour votre bonne humeur, pour votre soutien et pour tous ces twerks.

Tout ce groupe a été accueilli par le **Blue Moon**. Après avoir errés de terrasse en terrasse, nous avons trouvé notre deuxième maison. Merci à **Mika, Mimi et Toto** pour votre bonne humeur inégalable et surtout, merci d'avoir été là pour écouter nos rires, nos moments de doutes ou nos karaokés. Tous ces apéros n'auraient jamais été les mêmes sans vous.

À mes amis qui sont partis vivre à Paris (**Morgane, Boubou**) ou à Bruxelles (**Juliette, John, Élena**), merci d'avoir toujours été là et merci pour ces week-ends chez vous ou chez nous. Le plaisir de vous revoir est toujours immense !

Avec la fin de ce doctorat, je clos également dix ans de vie Strasbourgeoise. Dans cette aventure, plusieurs personnes m'ont suivies depuis le début (et plus). **Blandine**, je nous revois sur les bancs du lycée, nous voilà maintenant, toi architecte et moi sur le point de devenir docteur. Merci pour ces années de musique ensemble (dans la rue et dans les bars), de m'avoir fait découvrir Strasbourg et de me l'avoir fait l'aimer et merci pour tout ce que tu m'as donné toutes ces années. **Andréas**, les mots seraient trop faibles pour décrire tout ce que tu m'as

apporté. Merci d'avoir toujours été là, d'être mon pilier et de me pousser à grandir toujours plus.

Louise, Lison et Matthieu, merci à vous d'avoir été des repères et de m'avoir appris tellement. La biologie est une chose, l'humanité en est une autre et j'ai énormément appris grâce à vous.

Robin et Thibault, mes frères, nous avons pris des chemins tellement différents et pourtant notre unité fait notre force. Vivre ces dernières années à Strasbourg avec vous a été une joie immense. Merci d'avoir été toujours là pour moi, depuis le début. Je suis énormément fier de vous et j'espère que le destin nous réunira un jour.

À ma mère, **Florence**, mon beau-père, **Daniel**, et mes grands-parents **Mima et Pipa**, je vous remercie infiniment pour tout. Tout ce que je suis devenu est grâce à vous. Merci d'avoir été là et de m'avoir toujours suivi et soutenu. Je pense que c'est rare d'avoir une famille qui s'intéresse sincèrement au doctorat et au sujet de thèse de ses enfants, surtout sans être biologiste. Je vous suis éternellement reconnaissant pour tout l'amour et le soutien que vous m'avez apporté.

Ces mots sont les derniers rédigés de cette thèse, le chemin a été long, parfois difficile, parfois heureux mais toujours passionnant. Si c'était à refaire, sans hésiter.

Table des matières

INTRODUCTION.....	13
PARTIE I : LE VIRUS DE L'HEPATITE C ET L'INFLAMMATION HEPATIQUE CHRONIQUE.....	13
I. LE VIRUS DE L'HEPATITE C.....	15
1. GENERALITES.....	15
A. DECOUVERTE DU HCV	15
B. ÉPIDEMIOLOGIE	16
2. LE VIRUS DE L'HEPATITE C.....	18
A. CLASSIFICATION	18
B. LA PARTICULE VIRALE DU HCV.....	18
C. LE GENOME DU HCV	19
3. LE CYCLE VIRAL DU HCV.....	21
A. ATTACHEMENT ET ENTREE	22
B. TRADUCTION DE LA POLYPROTEINE VIRALE.....	24
C. REPLICATION DU GENOME VIRAL.....	28
D. ASSEMBLAGE ET EXPORT DU HCV.....	37
4. TRAITEMENTS ANTIVIRAUX CIBLANT LE HCV.....	39
A. PATHOGENESE ET GUERISON	39
B. LA REVOLUTION DES AGENTS ANTIVIRAUX A ACTION DIRECTE.....	39
II. REPONSES IMMUNITAIRES INNEE ET ADAPTATIVE LORS D'UNE INFECTION PAR LE HCV.....	41
1. LA REPOSE IMMUNITAIRE INNEE INTRACELLULAIRE	41
A. DETECTION DU HCV.....	41
B. REGULATION DE L'EXPRESSION DES ISG.....	43
C. MECANISMES DE CONTRE-DEFENSE DU HCV.....	51
2. LES REPONSES IMMUNITAIRES INNEE ET ADAPTATIVE INTRA-HEPATIQUES.....	55
A. LA REPOSE DES CELLULES <i>NATURAL KILLER</i>	55
B. LA MODULATION DE L'ACTIVATION DES CELLULES NK PAR LE HCV	56
C. LA REPOSE INFLAMMATOIRE.....	57

D.	L'IMMUNITE ADAPTATIVE	64
III.	<u>RACK1, SUPPORT DE REGULATION DE L'INFLAMMATION.....</u>	66
1.	STRUCTURE DE RACK1.....	66
2.	REGULATION DE L'EXPRESSION DE RACK1	67
3.	IMPLICATION DE RACK1 DANS DIFFERENTS CANCERS	68
4.	RACK1 ET LE RIBOSOME	70
5.	RACK1 ET VOIES DE SIGNALISATION	71
6.	RACK1 ET LES INFECTIONS VIRALES	74

**PARTIE II : LES VIRUS DE L'HEPATITE B ET D ET L'ETUDE DES INTERACTIONS VIRUS-HOTE PAR
CRIBLAGE HAUT-DEBIT** **77**

I. LE VIRUS DE L'HEPATITE D (TURON-LAGOT ET AL., 2020)..... **79**

II. LE VIRUS DE L'HEPATITE B..... **95**

1.	GENERALITES.....	95
A.	DECOUVERTE DU HBV	95
B.	ÉPIDEMIOLOGIE	96
2.	LE VIRUS DE L'HEPATITE B	97
A.	CLASSIFICATION	97
B.	LA PARTICULE VIRALE DU HBV.....	98
C.	LES PROTEINES D'ENVELOPPE DU HBV	99
D.	LE GENOME DU HBV	100
3.	LE CYCLE VIRAL DU HBV.....	102
A.	ATTACHEMENT ET ENTREE DU HBV.....	102
B.	FORMATION DE L'ADNCCC	103
C.	SYNTHESE DES PROTEINES ET REPLICATION VIRALE	104
D.	ASSEMBLAGE DES NUCLEOCAPSIDES ET TRANSCRIPTION INVERSE	105
E.	DEVENIR DES NUCLEOCAPSIDES ET SECRETION DES VIRIONS.....	107
4.	PHYSIOPATHOLOGIE DE L'HEPATITE B.....	107
A.	INFECTION AIGÛE RESOLUTIVE	107
B.	INFECTION CHRONIQUE	108

C.	PROGRESSION VERS LE CHC	110
5.	PREVENTION ET TRAITEMENTS.....	112
A.	VACCINATION.....	112
B.	TRAITEMENTS.....	113
III.	<u>L'ETUDE DES INTERACTIONS VIRUS-HOTE PAR CIBLAGE A HAUT DEBIT</u>	115
1.	INTRODUCTION	115
2.	LES CIBLAGES HIV ET LA DECOUVERTE DU MARAVIROC	117
3.	LES CIBLAGES SUR LE VIRUS INFLUENZA A	119
4.	LES CIBLAGES SUR LE VIRUS DE LA DENGUE	120
5.	LES CIBLAGES HCV	122
6.	LES CIBLAGES HBV/HDV	124
	<u>OBJECTIFS DE LA THESE</u>	127
	<u>RESULTATS.....</u>	145
	<u>PARTIE I : ÉTUDE DU ROLE DE RACK1 DANS LA REGULATION DE L'INFLAMMATION HEPATIQUE</u>	
	<u>LORS D'UNE INFECTION PAR HCV</u>	145
I.	<u>INTRODUCTION</u>	147
II.	<u>RESULTATS.....</u>	148
1.	EXPRESSION DE RACK1, IP-10 ET C-JUN CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS PAR LE HCV	148
2.	EXPRESSION DE RACK1 ET D'IP-10 ET ACTIVATION DE C-JUN DANS DES MODELES CELLULAIRES D'INFECTION PAR LE HCV	149
3.	RACK1 REGULE NEGATIVEMENT L'EXPRESSION D'IP-10.....	150
4.	L'ACTIVATION DE L'EXPRESSION D'IP-10 LORS DU SILENCING DE RACK1 N'EST PAS DUE A LA SECRETION D'UNE CYTOKINE	152
5.	A LA RECHERCHE DE LA VOIE DE SIGNALISATION IMPLIQUEE	153
A.	LA VOIE DE L'IFN DE TYPE II	153
B.	LA VOIE NF-κB.....	154
C.	CO-TRANSFECTION DE SIARN CIBLANT RACK1 ET DIFFERENTS FACTEURS DE TRANSCRIPTION	155

6.	LE ROLE DE RACK1 SUR LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION C-JUN	157
7.	RECHERCHE DU MECANISME IMPLIQUE DANS LA SUREXPRESSION DE C-JUN ET D'IP-10	159
A.	LE STRESS DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE.....	160
B.	L'AUTOPHAGIE.....	161
C.	EGFR.....	162
8.	EFFET DE LA DIMINUTION DE L'EXPRESSION DE RACK1 DANS DES CELLULES HUH7.5.1	163
9.	EFFET DE LA DIMINUTION DE L'EXPRESSION DE RACK1 DANS DES CELLULES HEPG2	164
10.	ÉTUDE DU TRANSCRIPTOME EN CONDITION DE SILENCING DE RACK1	165
11.	ÉTABLISSEMENT D'UNE LIGNEE PERMETTANT LE CRIBLAGE DE PETITES MOLECULES INHIBANT L'INTERACTION ENTRE RACK1 ET LE RIBOSOME	168
A.	ÉTABLISSEMENT D'UNE LIGNEE HUH7 RACK1 ^{KO}	169
B.	ÉTABLISSEMENT D'UNE LIGNEE HUH7 EXPRIMANT RACK1 ^{DE}	171
III.	<u>DISCUSSION</u>	173
1.	RACK1 ET L'INFLAMMATION HEPATIQUE	173
2.	RACK1 ET LE RIBOSOME	178
<u>PARTIE II : DECOUVERTE ET CARACTERISATION DE FACTEURS D'HOTES DU HDV ISSUS D'UN CRIBLAGE PAR PERTE-DE-FONCTION</u>		
<u>181</u>		
I.	<u>INTRODUCTION</u>	183
II.	<u>RESULTATS</u>	185
1.	VALIDATION DE CAD COMME FACTEUR D'HOTE DU HDV	185
2.	CARACTERISATION DU POUVOIR ANTIVIRAL DU PALA	185
3.	VALIDATION FONCTIONNELLE DU PALA DANS L'INHIBITION DE L'INFECTION PAR LE HDV	186
4.	MISE EN PLACE D'UNE LIGNEE HUH106 CAD^{KO}	187
5.	MINI-CRIBLAGE PAR PERTE-DE-FONCTION CIBLANT 10 GENES DE LA FAMILLE DES SLC	189
6.	CARACTERISATION DU ROLE DE SLC22A5 DANS L'INFECTION PAR HBV ET HDV	191
A.	VALIDATION DE SLC22A5 COMME FACTEUR D'HOTE DU HBV ET DU HDV	191
B.	ÉTABLISSEMENT DE LIGNEES SLC22A5 ^{KO}	193
C.	CARACTERISATION DU ROLE DE SLC22A5 DANS L'INFECTION PAR HDV ET HBV	194
7.	VALIDATION DU ROLE DE SLC2A2 DANS L'INFECTION PAR HBV	196

III. DISCUSSION.....	197
CONCLUSION	205
BIBLIOGRAPHIE.....	211
ANNEXE 1 : VERRIER <i>ET AL.</i>, HEPATOLOGY, 2018.....	283
ANNEXE 2 : VERRIER <i>ET AL.</i>, GUT, 2020	301
ANNEXE 3 : TURON-LAGOT <i>ET AL.</i>, VIROLOGIE, 2019.....	314

Table des figures

FIGURE 1 :	PREVALENCE MONDIALE DE L'HEPATITE C EN 2015.....	17
FIGURE 2 :	REPARTITION MONDIALE DES GENOTYPES DU HCV.....	17
FIGURE 3 :	ARBRE PHYLOGENETIQUE DE LA FAMILLE DES FLAVIVIRIDAE.....	18
FIGURE 4 :	STRUCTURE DE LA LIPOVIROPARTICULE (LVP).....	19
FIGURE 5 :	ORGANISATION GENOMIQUE DU HCV.....	20
FIGURE 6 :	CYCLE VIRAL DU HCV	22
FIGURE 7 :	ATTACHEMENT ET ENTREE DU HCV	23
FIGURE 8 :	MODELE CANONIQUE DE L'INITIATION DE LA TRADUCTION EUCARYOTE.....	25
FIGURE 9 :	INITIATION DE LA TRADUCTION IRES-DEPENDANTE DU HCV.....	27
FIGURE 10 :	STRUCTURE ET ASSOCIATION MEMBRANAIRE DU COMPLEXE NS3-4A.....	30
FIGURE 11 :	REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE ET DE LA TOPOLOGIE DE NS4B	31
FIGURE 12 :	REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ORGANISATION DES DOMAINES DE NS5A ET DE LA STRUCTURE DU DIMERE	32
FIGURE 13 :	REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE 3D DE NS5B	33
FIGURE 14 :	REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU MODELE DE LA REPLICATION ET DE L'ASSEMBLAGE DES PARTICULES VIRALES	36
FIGURE 15 :	DETECTION DU HCV PAR LES PRR (PATHOGEN RECOGNITION RECEPTOR) ET INHIBITION PAR LES PROTEINES VIRALES	42
FIGURE 16 :	LA VOIE CANONIQUE DE REGULATION DE L'EXPRESSION DES ISG (INTERFERON STIMULATED GENE)	44

FIGURE 17 :	MECANISMES CANONIQUES ET NON-CANONIQUES DE LA REGULATION DE L'EXPRESSION D'ISG	48
FIGURE 18 :	INDUCTION DE L'INFLAMMATION DE PAR LE HCV	58
FIGURE 19 :	ROLE DU MICROENVIRONNEMENT CELLULAIRE DANS L'INFLAMMATION HEPATIQUE CHRONIQUE	61
FIGURE 20 :	REPRESENTATION DE LA STRUCTURE CRISTALLOGRAPHIQUE DE LA PROTEINE RACK1 HUMAINE	67
FIGURE 21 :	ANALYSE BIOINFORMATIQUE DES DIFFERENTS ELEMENTS COMPRIS DANS LE PROMOTEUR DE RACK1	68
FIGURE 22 :	LES DIFFERENTS EFFETS DE L'INTERACTION DE RACK1 AVEC SES PARTENAIRES	69
FIGURE 23 :	INTERACTION DE RACK1 AVEC LA SOUS-UNITE RIBOSOMIQUE 40S	70
FIGURE 24 :	REGULATION DE L'ACTIVATION DE C-JUN PAR RACK1	73
FIGURE 25 :	PREVALENCE MONDIALE DE HBSAG (1957-2013)	97
FIGURE 26 :	REPARTITION GEOGRAPHIQUE DES GENOTYPES DU HBV	97
FIGURE 27 :	REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA PARTICULE VIRALE DU HBV	98
FIGURE 28 :	REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA TOPOLOGIE DES DIFFERENTES FORMES DE HBSAG	99
FIGURE 29 :	REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU GENOME DU HBV	101
FIGURE 30 :	REPRESENTATION DU CYCLE VIRAL DU HBV	103
FIGURE 31 :	REPRESENTATION DES ETAPES DE LA TRANSCRIPTION INVERSE DU HBV	106
FIGURE 32 :	CINETIQUES DE LA PRESENCE DE L'ADN HBV, DE HBSAG ET D'ALT (ALANINE AMINOTRANSFERASE) DANS LE SERUM DECRIVANT DIFFERENTES PHASES DE L'INFECTION CHRONIQUE PAR LE HBV	109
TABLEAU 1 :	SEQUENCES DES SGARN CLONES	140

FIGURE 33 :	ETUDE DE L'IMPACT DE L'INFECTION PAR LE HCV SUR L'EXPRESSION DE RACK1, IP-10 ET C-JUN CHEZ LES PATIENTS.....	148
FIGURE 34 :	IMPACT DE L'INFECTION PAR HCV SUR L'EXPRESSION DE RACK1 ET D'IP-10 ET SUR L'ACTIVATION DE C-JUN.....	149
FIGURE 35 :	LE <i>SILENCING</i> DE RACK1 DANS LES CELLULES HUH7 INDUIT UNE SUREXPRESSION D'IP-10	151
FIGURE 36 :	LE <i>SILENCING</i> DE RACK1 DANS LES PHH INDUIT UNE SUREXPRESSION D'IP-10	152
FIGURE 37 :	LA SUREXPRESSION D'IP-10 LORS DU <i>SILENCING</i> DE RACK1 EST DUE A UN EVENEMENT INTRACELLULAIRE.....	152
FIGURE 38 :	REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES VOIES DE SIGNALISATION MENANT A L'EXPRESSION D'IP-10 ET LES ROLES CONNUS DE RACK1.....	153
FIGURE 39 :	DETECTION DE LA PHOSPHORYLATION DE STAT1 LORS DU <i>SILENCING</i> DE RACK1	154
FIGURE 40 :	DETECTION DE LA RELOCALISATION NUCLEAIRE DE P65 LORS DU <i>SILENCING</i> DE RACK1	155
FIGURE 41 :	CO-TRANSFECTION DE SIRACK1 AVEC DES SIARN CIBLANT DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION	156
FIGURE 42 :	LA DIMINUTION DE L'EXPRESSION DE RACK1 INDUIT UNE SUREXPRESSION ET UNE SURACTIVATION DE C-JUN EN CELLULES HUH7	157
FIGURE 43 :	IMPACT DE LA DIMINUTION DE L'EXPRESSION DE RACK1 SUR L'EXPRESSION DE L'ARNM P65 ET D'IRF3 EN CELLULES HUH7	158
FIGURE 44 :	LA DIMINUTION DE L'EXPRESSION DE RACK1 INDUIT UNE LEGERE SUREXPRESSION DE C-JUN EN PHH.....	158
FIGURE 45 :	IMPACT DE LA DIMINUTION DE L'EXPRESSION DE RACK1 SUR L'EXPRESSION DE L'ARNM DE P65 ET D'IRF3 EN PHH.....	159
FIGURE 46 :	IMPACT DE LA DIMINUTION DE L'EXPRESSION DE RACK1 SUR LE STRESS DU RE	160

FIGURE 47 :	IMPACT DE LA DIMINUTION DE L'EXPRESSION DE RACK1 SUR L'ACCUMULATION D'ACIDES GRAS.....	162
FIGURE 48 :	ÉTUDE DU ROLE DE L'ACTIVATION D'EGFR DANS LA SUREXPRESSION D'IP-10 162	
FIGURE 49 :	LA DIMINUTION DE L'EXPRESSION DE RACK1 INDUIT LA SUREXPRESSION D'IP-10 ET LA SURACTIVATION DE C-JUN EN CELLULES HUH7.5.1.....	163
FIGURE 50 :	LA DIMINUTION DE L'EXPRESSION DE RACK1 INDUIT LA SUREXPRESSION DE C-JUN EN CELLULES HEPG2	165
FIGURE 51 :	LA DIMINUTION DE L'EXPRESSION DE RACK1 INDUIT LA SUREXPRESSION DE GENES IMPLIQUES DANS LES VOIES RIG-I ET NF-κB	166
FIGURE 52 :	ANALYSE DU TRANSCRIPTOME PAR ENRICHISSEMENT DE GROUPES DE GENES 167	
FIGURE 53 :	ANALYSE COMPARATIVE DE TRANSCRIPTOMES ISSUS DE CELLULES DEpletees DE RACK1 ET DE PATIENTS INFECTES PAR LE HCV.....	168
FIGURE 54 :	ÉTUDE DE LA LIGNEE HUH7-CAS9 RACK1^{KO}	170
FIGURE 55 :	ÉTABLISSEMENT D'UNE LIGNEE HUH7 EXPRIMANT RACK1^{WT} ET RACK1^{DE} ...	171
FIGURE 56 :	MISE EN PLACE DE LA LIGNEE HUH7-CAS9 EXPRIMANT RACK1^{WT} ET RACK1^{DE} 172	
FIGURE 57 :	VALIDATION DE CAD COMME FACTEUR D'HOTE DE L'INFECTION PAR HDV	185
FIGURE 58 :	PALA, UN INHIBITEUR DE CAD, INHIBE L'INFECTION HDV DE MANIERE DOSE-DEPENDANTE 186	
FIGURE 59 :	CARACTERISATION FONCTIONNELLE DU ROLE DE CAD DANS L'INFECTION HDV 187	
FIGURE 60 :	MISE EN PLACE DU LIGNEE HUH106 CAD^{KO}	188
TABLEAU 2 :	Liste des noms du gene et de la proteine ainsi que de la fonction des 10 proteines de la famille des SLC cibles dans le mini-criblage	189

FIGURE 61 :	MINI-CRIBLAGE PAR PERTE DE FONCTION CIBLANT DES PROTEINES SLC POUR L'IDENTIFICATION DE FACTEURS D'HOTES IMPLIQUES DANS L'ENTREE DU HDV ET DU HBV	190
FIGURE 62 :	VALIDATION DE SLC22A5 COMME FACTEUR D'HOTE IMPLIQUE DANS LE CYCLE VIRAL DU HBV ET DU HDV.....	192
FIGURE 63 :	MISE EN PLACE DU LIGNEE HUH7-NTCP SLC22A5^{KO}	194
FIGURE 64 :	ÉTUDE DE L'EFFET D'UN TRAITEMENT A LA CARNITINE SUR L'INFECTION HDV	195
FIGURE 65 :	ETUDE DE L'IMPLICATION DE SLC22A5 DANS L'ATTACHEMENT DES PARTICULES DU HDV	196
FIGURE 66 :	VALIDATION DU ROLE DE SLC2A2 DANS L'INFECTION PAR HBV	197
FIGURE 67 :	ÉTUDE DE L'IMPACT DE L'INFECTION PAR HBV SUR L'EXPRESSION DE SLC2A2	201

Liste des abréviations

AANE	Acides aminés non-essentiels
ADNc	ADN complémentaire
ADNccc	ADN circulaire clos de manière covalente
ADNcr	ADN circulaire relâché
AgHBe	Antigène HBe
AgHBs	Antigène de surface du HBV
AIM2	<i>Absent in melanoma 2</i>
ALT	Alanine aminotransférase
AMPK	<i>Adenosine monophosphate-activated kinase</i>
ARNdb	ARN double-brin
ARNlnc	ARN long non-codant
ARNm	ARN messenger
ARNpg	ARN pré-génomique
ARNpol II	ARN polymérase II
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
ATG14	<i>Autophagy related 14</i>
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
C/EBP- β	<i>C/CAAAT/enhancer-binding protein-β</i>
CAD	<i>Carbamoyl-phosphatesynthetase 2, aspartate transcarbamylase and dihydroorotase</i>
CagA	<i>Cytotoxin-associated gene A</i>
CAM	<i>Capsid assembly modulator</i>
CARD	<i>Caspase recruitment domain</i>
CCDC115	<i>Coiled-coil domain containing 115</i>
CCT	<i>Chaperonin TRiC</i>
CD	Cellule dendritique
CDKN2C	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 2C</i>
CDm	Cellule dendritique myéloïde
CDp	Cellule dendritique plasmacytoïde
cGL	Gouttelette lipidique cytosolique
CHC	Carcinome hépatocellulaire
CHS	Cellules hépatiques stellaires
CK	Cellules de Kupffer
CKI- α	<i>Casein kinase I-α</i>
CLDN1	Claudin-1
CMTR1	<i>Cap methyltransferase 1</i>

CP	Promoteur Core
cPLA2	<i>Cytosolic phospholipase A2</i>
CRE	Élément de réplication agissant en <i>cis</i>
CrPV	<i>Cricket paralysis virus</i>
DAA	<i>Direct-acting antiviral</i>
DAMP	<i>Damage associated molecular pattern</i>
DDB1	<i>UV-damaged DNA binding protein 1</i>
DENV	Virus de la dengue
DGAT1	<i>Diacylglycerol O-acetyltransferase 1</i>
DHO	Dihydroorotate
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMV	Vésicule à double membrane
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffer Saline</i>
DPMS	<i>Dolichol-phosphate mannose synthase</i>
eEF1A2	<i>Eukaryotic translation elongation factor 1A isoform 2</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
eIF	<i>Eukaryotic initiation factor</i>
EMC	<i>ER membrane protein complex</i>
EMC2	<i>ER membrane protein complex subunit 2</i>
EMC3	<i>ER membrane protein complex subunit 3</i>
EMCV	<i>Encephalomyocarditis virus</i>
EMT	Transition épithélio-mésenchymateuse
EphA2	<i>Ephrin receptor A2</i>
ERK	<i>Extracellular regulated-signal kinase</i>
ERO1A	<i>Endoplasmic reticulum oxidoreductin 1α</i>
ESR1	<i>Estrogen receptor 1</i>
FBW7	<i>F-Box and WD repeat domain containing 7</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FEN1	<i>Flap structure-specific endonuclease 1</i>
FFA	<i>Free fatty acid</i>
FOXO3	<i>Forkhead box O3</i>
GAS	<i>γ-activated sequence</i>
GATE	<i>γ-IFN-activated transcriptional element</i>
GBD	Charge mondiale de morbidité
GBF1	<i>GATE-binding factor 1</i>
Glu	Glutamine
GLUT2	<i>Glucose transporter 2</i>
GPC5	Glypican 5
GSEA	<i>Gene set enrichment analysis</i>
HAT	<i>Histone acetyltransferase</i>

HAV	Virus de l'hépatite A
HBV	Virus de l'hépatite B
HCV	Virus de l'hépatite C
HCVpp	Pseudoparticule HCV
HDAC	<i>Histone deacetylase</i>
HDAg	Antigène delta
HDV	Virus de l'hépatite D
HIF-1 α	<i>Hypoxia-inducible factor-1α</i>
HIV	Virus de l'immunodéficience humaine
HMG-14	<i>High-mobility group (nonhistone chromosomal) protein 14</i>
HNANB	Hépatite non-A, non-B
HPV	<i>Human papillomavirus</i>
HRP	<i>Horseradish peroxydase</i>
Hsc70	<i>Heat shock cognate 70</i>
Hsp40	<i>Heat shock protein 40</i>
HSPG	Protéoglycane à héparane sulfate
HSV-1	<i>Herpes simplex virus 1</i>
HTA	<i>Host-targeting agent</i>
IAV	Virus Influenza A
ICTV	Comité international de la taxonomie des virus
IFN	Interféron
IFNAR	<i>IFN-α receptor</i>
IFNGR	<i>IFN-γ receptor</i>
IFN λ R1	<i>IFN-λ receptor 1</i>
IFNLR	Récepteur à l'interféron λ
IGF-1R	<i>Insulin-like growth factor-1 receptor</i>
I κ B- β	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit beta</i>
IKBKE	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit epsilon</i>
IKBKG	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit gamma</i>
IKK	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase</i>
IL	Interleukine
IP-10	<i>10 KDa Interferon Gamma-Induced Protein</i>
IR	<i>Insulin receptor</i>
IRES	Site d'entrée interne du ribosome
IRF3	<i>Interferon regulatory factor 3</i>
IRF9	<i>Interferon regulatory factor 9</i>
ISG	<i>Interferon stimulated gene</i>
ISGF3	<i>IFN-stimulated gene factor 3</i>
ISRE	<i>IFN-stimulated response element</i>
ITAF	<i>IRES trans-acting factor</i>
JAK1	<i>Janus kinase 1</i>

JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kb	Kilobase
kpb	Kilo paire de base
LCS1	Séquence de faible complexité 1
LDL	Lipoprotéine de basse densité
LDLr	Récepteur des LDL
LINE1	<i>Long interspersed nuclear element 1</i>
LT	Lymphocyte T
LUBAC	<i>Linear ubiquitin chain assembly complex</i>
LVP	Lipoviroparticule
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MAVS	<i>Mitochondrial antiviral-signaling protein</i>
MED	Complexe médiateur
MEK	<i>MAPK/ERK kinase</i>
MEKK1	<i>MAPK/ERK kinase kinase 1</i>
MERS-CoV	<i>Middle Eastern respiratory syndrome-Coronavirus</i>
MDA5	<i>Melanoma differentiation-associated protein 5</i>
MICA/B	<i>MHC class I-related chain A and B</i>
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
miR	micro ARN
MKK3	<i>MAP kinase kinase 3</i>
MKK6	<i>MAP kinase kinase 6</i>
MLK3	<i>Mixed lineage kinase 3</i>
MMP3	<i>Matrix metalloproteinase 3</i>
MMP13	<i>Matrix metalloproteinase 13</i>
MVB	Corps multivésiculaire
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NAFLD	<i>Non-alcoholic fatty liver disease</i>
NCOR2	<i>Nuclear corepressor 2</i>
NEMO	<i>NF-κB essential modulator</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NFKBIA	<i>NF-κB inhibitor alpha</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NKRF	<i>NF-κB repressing factor</i>
NLR	<i>Nod-like receptor</i>
NLRP3	<i>NLR family pyrin domain containing 3</i>
NLS	Signal de localisation nucléaire
NOX1	<i>NADPH oxidase 1</i>
NPC1	<i>Niemann-Pick-type C1</i>
NSAP1	<i>NS1 associated protein 1</i>

nt	Nucléotide
NTCP	<i>Sodium taurocholate co-transporting polypeptide</i>
OCLN	Occludine
OCTN2	<i>Organic cation/carnitine transporter 2</i>
OGT	<i>O-linked N-acetylglucosamine transferase</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORF	Cadre de lecture ouverte
OSBP	<i>Oxysterol binding protein</i>
OST	Oligosaccharyltransférase
PALA	Acide N-(phosphonoacetyl)-L-aspartique
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PCBP2	<i>Poly(rC) binding protein 2</i>
PD-1	<i>Programmed cell death 1</i>
PDI	<i>Protein disulfide isomerase</i>
PEG-IFN- α	Interferon α pégylé
PHH	Hépatocyte primaire humain
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PI4KA	<i>Phosphatidylinositol 4-kinase IIIα</i>
PI4P	Phosphatidylinositol-4-phosphate
PIAS	<i>Protein inhibitor of activated STAT</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
PKC β II	Protéine kinase C bêta II
PKR	<i>Protein kinase R</i>
PP2A	Protéine phosphatase 2A
PREB	<i>Prolactin regulatory element binding protein</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
PTP1B	<i>Protein tyrosine phosphatase 1B</i>
PTPN11	<i>Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11</i>
PVDF	Polyfluorure de vinylidène
RACK1	<i>Receptor for activated C kinase 1</i>
RBV	Ribavirine
RdRp	ARN polymérase ARN dépendante
RE	Réticulum endoplasmique
RHV1	Région hypervariable 1
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene-1</i>
RLR	<i>RIG-I like receptor</i>
ROS	Espèces actives de l'oxygène
RT	Transcriptase inverse
RTG	Réseau trans-golgien
RVS	Réponse virale soutenue

SARS-CoV-1	<i>Severe acute respiratory syndrome-Coronavirus-1</i>
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
shARN	<i>short hairpin</i> ARN
SHPTP1	<i>SH2 domain-containing tyrosine phosphatase 1</i>
SLC	<i>Solute carrier family member</i>
Smc5/6	<i>Structural maintenance of chromosomes 5/6</i>
SOCS1	<i>Suppressor of cytokine signalling 1</i>
SR-BI	<i>Scavenger receptor class B, member 1</i>
STAT1	<i>Signal transducer and activator of transcription 1</i>
STAT2	<i>Signal transducer and activator of transcription 2</i>
STING	<i>Stimulator of IFN genes</i>
SVF	Sérum de veau foetal
SVP	Particules sous-virales
TANK	<i>TRAF family member associated NF-kB activator</i>
TBK1	<i>TANK binding kinase 1</i>
TBS	<i>Tris buffer saline</i>
TCID ₅₀	<i>Median tissue culture infectious dose</i>
TCPTP	<i>T-cell protein tyrosine phosphatase</i>
TDP2	<i>Tyrosyl DNA phosphodiesterase-2</i>
TGF- α	<i>Transforming growth factor alpha</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TIP47	<i>Tail interacting protein of 47 kDa</i>
TLR3	<i>Toll-like receptor 3</i>
TMEM199	<i>Transmembrane protein 199</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TP	Protéine terminale
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
TRAF	Facteur associé au récepteur du TNF
TRAIL	<i>Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRIF	<i>TLR domain containing adapter-inducing IFN-β</i>
TRIM45	<i>Tripartite motif containing 45</i>
TXNIP	<i>Thioredoxin interacting protein</i>
TYK2	<i>Tyrosine kinase 2</i>
UMP	Uridine monophosphate
UTR	Région non-traduite
VacA	<i>Vacuolating cytotoxin A</i>
VAP-A	<i>Vesicle-associated membrane protein-associated protein A</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VLDL	Lipoprotéine de très basse densité
VSV	Virus de la stomatite vésiculaire

WDR7	<i>WD repeat domain 7</i>
WNV	<i>West Nile virus</i>
YFV	<i>Yellow fever virus</i>
ZBP1	<i>Zipcode binding protein 1</i>
ZIKV	<i>Virus Zika</i>

Introduction

Partie I : Le virus de l'hépatite C et l'inflammation
hépatique chronique

I. Le virus de l'hépatite C

1. Généralités

a. Découverte du HCV

Au début du XX^{ème} siècle, le seul virus connu causant des hépatites virales était le virus de l'hépatite A (HAV). Dans les années 1930 et 1940, des campagnes de vaccination contre la rougeole, les oreillons et la fièvre jaune ont donné lieu à des épidémies d'hépatite (Trepo, 2014). Le HAV étant transmis de manière oro-fécale, les scientifiques ont suggéré qu'un autre virus, transmis de manière différente, pouvait causer ces hépatites. Cette forme d'hépatite a d'abord été nommée hépatite B ou hépatite sérique, car les vaccins utilisés pouvaient contenir du sérum humain qui, s'il était contaminé, causait alors l'hépatite. Après la découverte du virus de l'hépatite B (HBV) dans les années 1960 et le développement de tests de dépistage, les médecins ont observé que des patients négatifs à l'infection par le HBV développaient tout de même une hépatite. Au début des années 1970, il a été observé que cette troisième hépatite virale était transmise lors d'une transfusion sanguine et qu'elle n'était ni causée par le HAV, ni par le HBV. Ce syndrome hépatique nouveau a été nommé hépatite non-A, non-B (HNANB) en 1975 (Feinstone *et al.*, 1975). Quelques années plus tard, le développement d'un modèle d'infection chez le chimpanzé pouvant récapituler les HNANB aiguë et chronique, suite à l'infection par du sang provenant de patients atteints de HNANB, a constitué un progrès considérable (Alter *et al.*, 1978; Hollinger *et al.*, 1978; Tabor *et al.*, 1978). Les études menées sur ce modèle ont suggéré l'existence d'au moins deux agents différents pouvant causer une HNANB (Hollinger *et al.*, 1980), cependant les recherches sur l'identification de ce ou ces pathogènes sont restées très largement infructueuses pendant une dizaine d'années.

Au début des années 1980, deux études ont permis de montrer que l'agent infectieux responsable de ce syndrome est pourvu d'une enveloppe lipidique (Feinstone *et al.*, 1983) et que son diamètre est compris entre 30 et 60 nm (He *et al.*, 1987). Une approche moléculaire ambitieuse a par la suite permis l'extraction du génome viral, à partir du plasma de chimpanzés infectés ayant un haut titre viral, puis la synthèse d'une banque d'ADNc (ADN complémentaire) qui a pu être insérée dans un vecteur d'expression permettant l'expression des protéines virales dans un système bactérien (Choo *et al.*, 1989). Des millions de clones bactériens ont été criblés avec un sérum de patient atteint de HNANB et un seul de ces clones

a permis l'immunodétection de l'agent infectieux (Kuo *et al.*, 1989). Cette révolution a permis le développement du premier test de dépistage sanguin ainsi que le séquençage complet du génome de cet agent viral alors renommé virus de l'hépatite C (HCV).

b. Épidémiologie

L'infection chronique par le HCV cause de graves maladies hépatiques telle que la cirrhose hépatique, et peut évoluer vers le carcinome hépatocellulaire (CHC) en l'absence de traitement. C'est pourquoi, plus de 30 ans après sa découverte, le HCV reste un problème majeur de santé publique. Au début des années 2000, il était estimé que 184 millions de personnes étaient chroniquement infectées par le HCV dans le monde, représentant 2,8 % de la population mondiale (NIH, 2002). Depuis, cette estimation a été revue à la baisse, considérant maintenant que les personnes infectées par le HCV représentent 1 % de la population mondiale, soit 71 millions de personnes (Blach *et al.*, 2017). Ce chiffre est toutefois largement sous-estimé par le manque de diagnostic et de répertoriage des patients infectés. Les infections par le HCV sont inégalement réparties dans le monde. L'Égypte est le pays le plus touché avec une prévalence de 6,3 %, attribuée en partie à une campagne massive de traitement contre la bilharziose ayant eu lieu entre les années 1950 et 1980 impliquant un partage de seringues insuffisamment stérilisées (Strickland, 2006), alors qu'en Europe de l'ouest la prévalence est de 0,5 % (Blach *et al.*, 2017). Les régions les plus touchées sont l'Asie centrale (3,6 %), l'Europe de l'est (3,3 %) et l'Afrique centrale (2,1 %) (**Figure 1**). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'en 2015, il y a eu 1,75 million de nouvelles infections par le HCV dans le monde et qu'environ 399 000 patients sont décédés de maladies hépatiques imputées à une infection par le HCV (OMS, <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>). En France, il est estimé que 193 000 personnes sont atteintes d'hépatite C chronique (INSERM, <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/hepatite>). Cette estimation datant de 2016 est en baisse depuis 2014, grâce aux nouveaux traitements basés sur l'inhibition directe du rôle de différentes protéines du HCV permettant une élimination du virus chez plus de 95 % des patients infectés (voir « Traitements antiviraux ciblant le HCV », page 26).

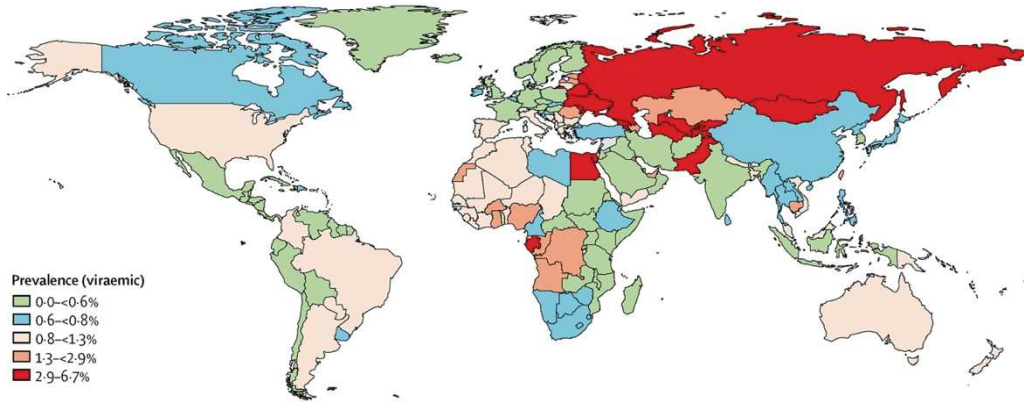


Figure 1 : Prévalence mondiale de l'hépatite C en 2015 (Blach *et al.*, 2017).

Le HCV présente une grande diversité génétique, 7 génotypes ont été décrits, chaque génotype différant des autres de 30-35 % au niveau de sa séquence nucléotidique (Messina *et al.*, 2015). La prévalence des génotypes est inégale, le génotype 1 étant le plus répandu (44 % des infections totales), suivi par le génotype 3 (25 %) et le génotype 4 (15 %) (Blach *et al.*, 2017). De plus, leur distribution géographique diffère, le génotype 1 étant majoritairement retrouvé en Amérique du nord et du sud, en Europe, en Afrique de l'ouest, en Asie du sud-est et en Océanie, le génotype 3 étant prédominant en Asie du sud et le génotype 4 étant majoritaire en Afrique centrale et au Moyen-Orient (Figure 2).

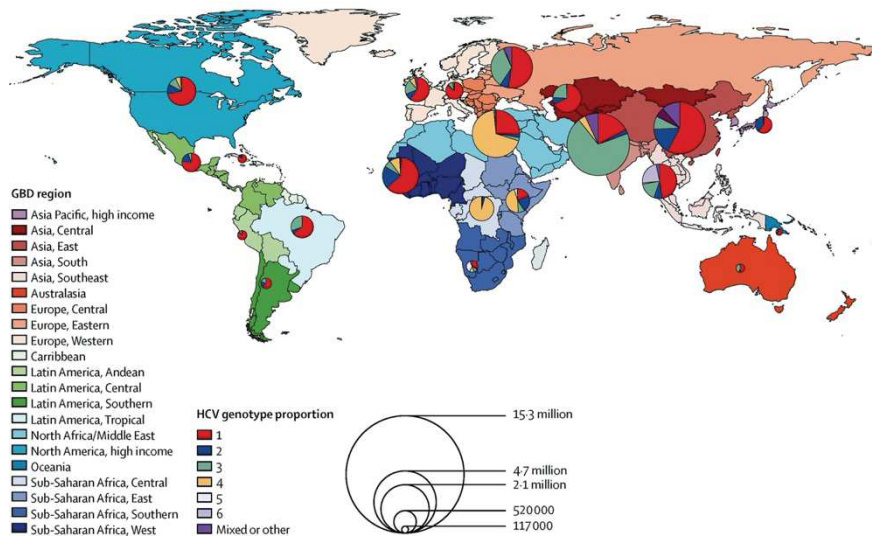


Figure 2 : Répartition mondiale des génotypes du HCV. Les pays sont répartis en fonction de la charge mondiale de morbidité (GBD – *Global burden of disease*) définie par l'OMS (Blach *et al.*, 2017).

2. Le virus de l'hépatite C

a. Classification

Le Comité International de la Taxonomie des Virus (ICTV), ayant pour rôle d'établir la classification des virus adoptée par la communauté scientifique a récemment mis à jour cette classification. Le HCV fait partie de la famille des *Flaviviridae* et du genre des Hepacivirus. La famille des *Flaviviridae* comprend également trois autres genres à savoir les Flavivirus (incluant le virus de la dengue et le virus Zika), les Pegivirus et les Pestivirus (incluant le virus de la diarrhée bovine, désormais renommé Pestivirus A). Le genre des Hepacivirus comprend 14 espèces (A-N) dont l'espèce Hepacivirus A incluant les hepacivirus équin et canin et l'espèce Hepacivirus B incluant le virus GB infectant les tamarins (Bukh *et al.*, 2008) (**Figure 3**).

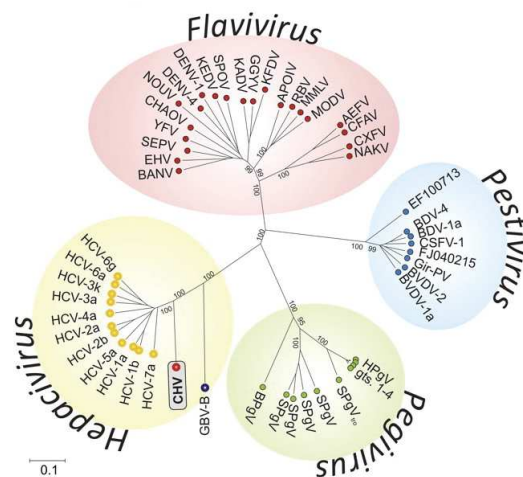


Figure 3 : Arbre phylogénétique de la famille des Flaviviridae. La famille des *Flaviviridae* comprend 4 genres : les Flavivirus, les Pestivirus, les Pegivirus et les Hepacivirus dont fait partie le HCV. L'analyse phylogénétique est basée sur la conservation de la séquence des positions 7705-8550 de l'ARN polymérase virale (référence : HCV génotype 1a AF011751). L'arbre est construit par *neighbour-joining* par analyse bioinformatique. Une divergence de 10 %, correspondant à l'échelle 0,1, est représentée (Kapoor *et al.*, 2011).

b. La particule virale du HCV

Les particules du HCV sont sphériques et ont un diamètre compris entre 50 et 80 nm. Leur génome est entouré d'une capsidie icosaédrique composée de la protéine Core, elle-même enveloppée d'une membrane dérivée du réticulum endoplasmique (RE) dans laquelle sont enchâssées les glycoprotéines d'enveloppe virales E1 et E2. La particule virale possède la particularité d'être associée aux lipoprotéines de basse (LDL) et de très basse densité (VLDL) telles que apoA1, apoB-100, apoC et apoE, alors appelée lipoviroparticule (LVP). La LVP est la forme infectieuse du virus (**Figure 4**) (Catanese *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2007; Meunier *et al.*,

2008; Piver *et al.*, 2017). L'association de la particule virale avec les LDL et les VLDL est nécessaire au virus à la fois pour son entrée et pour la production de particules virales (voir « Cycle viral », page 8). De plus, les lipoprotéines masquent les antigènes du HCV permettant alors d'échapper aux anticorps neutralisants produits par le système immunitaire de l'hôte (Di Lorenzo *et al.*, 2011; Fauvelle *et al.*, 2016).

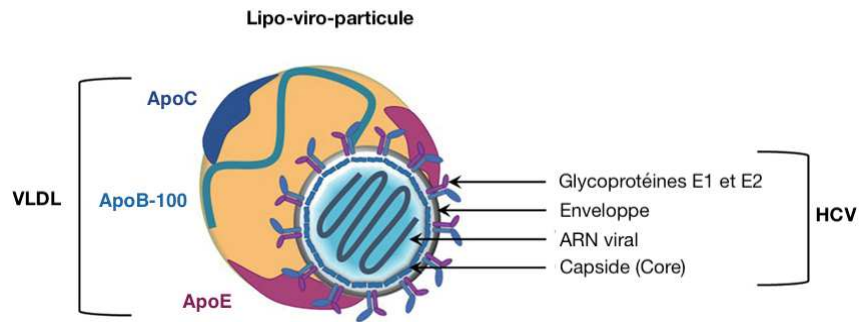


Figure 4 : Structure de la lipoviroparticule (LVP). La particule virale du HCV comprend l'ARN viral protégé par une capsidie icosaédrique formée par des multimères de Core et enveloppée d'une membrane dérivée du RE dans laquelle sont enchâssées les glycoprotéines virales E1 et E2. Lors de la sécrétion, le virus s'associe aux VLDL telles que ApoB-100, ApoC et ApoE formant la LVP (adapté de Wrensch *et al.*, 2018).

c. Le génome du HCV

Le génome du HCV est un ARN simple brin de polarité positive et d'une taille de 9,6 kb (kilobase). Il contient un seul grand cadre de lecture ouverte (ORF) flanqué de part et d'autre de régions 5' et 3' non-traduites (UTR) très structurées. L'ORF permet la traduction d'une polyprotéine de plus de 3000 acides aminés qui sera clivée co- et post-traductionnellement par des protéases cellulaires et virales pour donner naissance aux protéines virales structurales (core, E1 et E2) et non-structurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) (Khawaja *et al.*, 2015). L'initiation de la traduction du HCV est guidée par un site d'entrée interne du ribosome (IRES – *Internal Ribosome Entry Site*) (Figure 5).

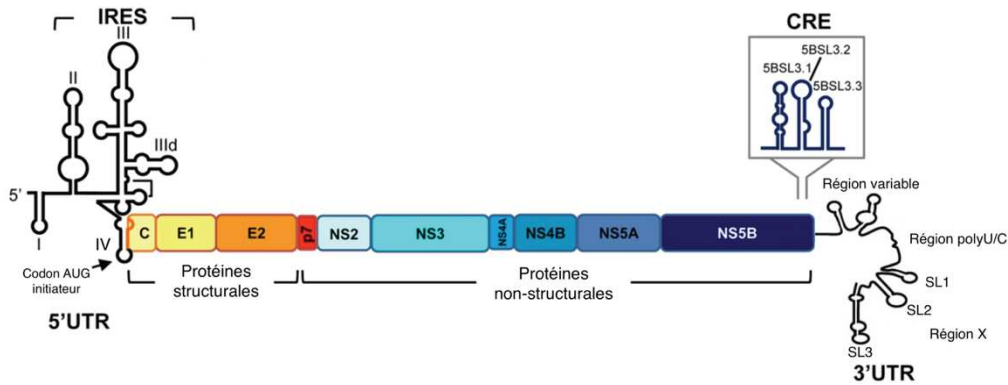


Figure 5 : Organisation génomique du HCV. Le génome du HCV et ses propriétés structurales sont représentés ci-dessus. La région 5' UTR se structure en 4 tiges-boucles (SLI-IV) formant l'IRES impliqué dans l'initiation de la traduction de la polyprotéine virale. Le codon AUG initiateur de Core (C) ainsi que les différentes protéines virales structurales et non-structurales sont représentées sur l'ORF unique de la polyprotéine. La séquence de NS5B contient différentes tiges-boucles (5BSL3.1-3) formant l'élément CRE. La région 3' UTR est composée d'une région variable, suivie d'une région polyU/C et d'une région X contenant 3 tiges-boucles (SL1-3) impliquées dans la réplication virale (adapté de Romero-López *et al.*, 2018)

L'IRES se trouve dans la région 5' UTR du génome du HCV et a une taille de 300 nt (nucléotide) organisés en trois domaines nommés II, III et IV. Le domaine I de la région 5' UTR, se trouvant en amont de l'IRES, possède notamment un site de liaison au miR-122, nécessaire à la stabilité structurale de l'IRES (Sarnow & Sagan, 2016; Schult *et al.*, 2018). La partie basale du domaine III ainsi que le domaine IV interagissent avec le dos de la sous-unité ribosomique 40S (Kieft *et al.*, 2001; Kolupaeva *et al.*, 2000; Quade *et al.*, 2015) et la partie apicale du domaine III permet le recrutement du facteur d'initiation de la traduction eIF3 (eIF - *Eukaryotic initiation factor*) (Sizova *et al.*, 1998). Le domaine II est une tige-boucle formant une structure en L et contenant un domaine basal IIa et un domaine apical IIb (Quade *et al.*, 2015). Le domaine IIb interagit avec la sous-unité ribosomique 40S induisant un changement conformationnel de celle-ci (Spahn *et al.*, 2001). Il permet également le relargage du facteur eIF2 (Locker *et al.*, 2007) et la transition de l'étape d'initiation de la traduction vers l'élongation (Filbin *et al.*, 2013). La partie basale du domaine III, appelée domaine III f, contient le codon AUG initiateur et interagit avec la protéine ribosomique eS28, se trouvant à la sortie du canal de l'ARNm (ARN messenger), permettant le bon positionnement du codon AUG (Berry *et al.*, 2010, 2011). En effet, l'initiation de la traduction du génome du HCV ne se fait pas par balayage de la région 5' UTR afin de trouver le codon AUG initiateur, mais la structure IRES permet le recrutement de la sous-unité 40S du ribosome directement sur le codon initiateur.

La région 3' UTR du génome du HCV, d'une taille variant de 200 à 235 nt, est très conservée et comporte différentes structures secondaires. Elle est composée d'une région variable, suivie d'une région polyU/UC et de 3 structures en tige-boucle (SL1-3) formant la région X (Bai *et al.*, 2013). La région 3' UTR est impliquée dans l'initiation de la traduction du HCV ainsi que dans l'initiation de la synthèse du brin antisens lors de la réplication virale. En effet, des études ont montré que la région polyU/UC ainsi que la tige-boucle SL1 de la région X peuvent promouvoir l'initiation de la traduction IRES-dépendante du HCV en *cis* (Ito *et al.*, 1998; Song *et al.*, 2006). La région 3' UTR interagit avec la sous-unité ribosomique 40S proche de l'entrée et de la sortie du canal de l'ARNm (Bai *et al.*, 2013). Cette interaction est chevauchante avec l'interaction IRES-40S, dont l'affinité est plus forte. Il semblerait que la région 3' UTR ne soit pas impliquée dans le premier tour de traduction mais qu'elle faciliterait l'initiation de nouveaux tours de traduction en *cis* en retenant le ribosome et en le rapprochant de la région 5' UTR lors de la fin de la traduction. Cependant, ce modèle est encore débattu car différentes études ont observé que la région 3' UTR n'avait aucun effet (Kong & Sarnow, 2002) voire un effet inhibiteur sur la traduction (Murakami *et al.*, 2001). En plus de son rôle potentiel dans la traduction, la région 3' UTR est impliquée dans la réplication du HCV. La tige-boucle SL2 de la région X interagit avec une tige-boucle présente dans la séquence de NS5B afin de former un complexe essentiel à la synthèse de l'ARN antigénomique (Friebe *et al.*, 2005; You *et al.*, 2004). Enfin, la région X contient un signal d'encapsidation dans les tiges-boucles SLI et SLII permettant le recrutement de la protéine de capsid Core (Shi *et al.*, 2016). La région 3' UTR étant impliquée dans plusieurs étapes cruciales du cycle viral du HCV, il est fortement suggéré qu'elle intervienne également dans la régulation temporelle de ces étapes.

3. Le cycle viral du HCV

Le développement de modèles d'étude simples récapitulant l'ensemble du cycle viral du HCV ont permis l'étude et l'approfondissement des connaissances des différentes étapes le composant. Le cycle viral peut être divisé en 6 étapes distinctes de l'attachement et l'entrée du virus dans la cellule hôte, la fusion membranaire permettant la libération du génome viral dans le cytoplasme, la traduction permettant la synthèse des différentes protéines virales, la réplication, puis l'assemblage de nouveaux virions et leur export (**Figure 6**). Chaque étape du

cycle est fortement dépendante de différents composants de la cellule hôte, que ce soient des protéines, des acides nucléiques ou des membranes.

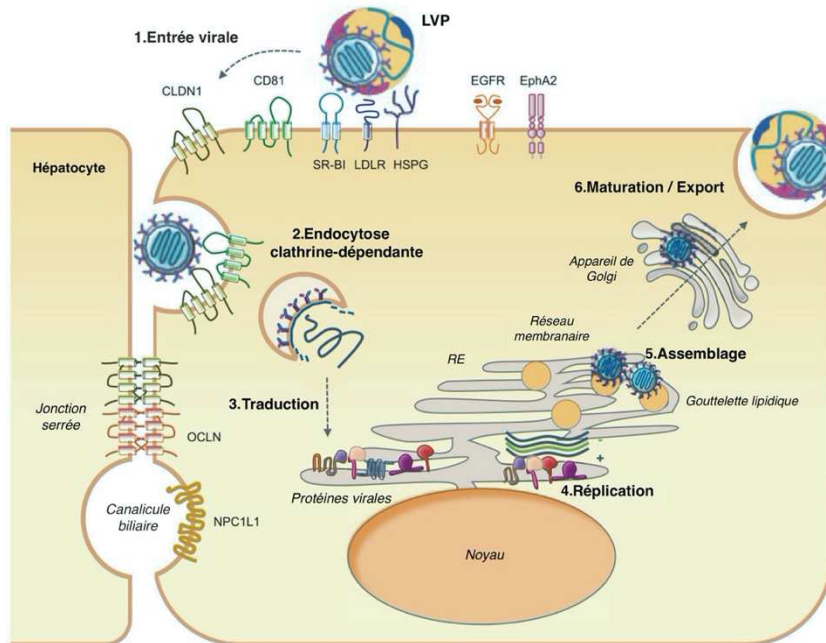


Figure 6 : Cycle viral du HCV. (1) Les LVP s'attachent à la surface des hépatocytes puis (2) entrent dans la cellule grâce à des interactions avec de nombreux facteurs d'entrée. L'enveloppe virale fusionne avec l'enveloppe de l'endosome et le génome est libéré par décapsidation. (3) La polyprotéine virale est traduite puis maturée en 10 protéines virales qui s'ancrent dans la membrane du RE. (4) Le complexe de réplication viral amplifie le génome viral au niveau du réseau membranaire formé de membranes dérivées du RE. (5) Les particules virales s'assemblent à la surface des gouttelettes lipidiques. (6) Elles sont ensuite mûries puis exportées via l'appareil de Golgi (adapté de Crouchet *et al.*, 2018).

a. Attachement et entrée

Chez les patients infectés, le HCV circule dans le sang pour se retrouver en contact de la membrane basolatérale des hépatocytes au niveau de l'espace de Disse. La première étape du cycle viral consiste à l'attachement des virions à la membrane des hépatocytes (**Figure 7**). Lors de cette étape, la forme LVP du HCV est particulièrement importante car l'attachement est réalisé par l'interaction d'apoE avec les protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG) (Jiang *et al.*, 2012a). Il a également été montré que le récepteur des LDL (LDLr) peut interagir avec apoE au niveau de la LVP et que cette interaction est nécessaire à l'infection virale (Hishiki *et al.*, 2010; Owen *et al.*, 2009). Cependant, une étude contradictoire a montré que cette interaction mène à une internalisation non-productive des particules virales (Albecka *et al.*, 2012). Enfin, le récepteur SR-BI (*Scavenger receptor class B, member 1*) a été décrit comme

Introduction – Partie I

facteur d'attachement de la LVP pouvant interagir avec apoE et la glycoprotéine virale E2 (Catanese *et al.*, 2010; Dao Thi *et al.*, 2012; Zeisel *et al.*, 2007). Il est proposé que l'interaction de la LVP avec SR-BI induit une modification du profil lipoprotéique du virion ainsi qu'un enrichissement de la membrane plasmique en cholestérol. Ceci permettrait de libérer de nouveaux épitopes des glycoprotéines d'enveloppe virale E1 et E2 ainsi que la localisation des différents récepteurs du HCV, favorisant leur interaction avec E1 et E2 (Dao Thi *et al.*, 2012).

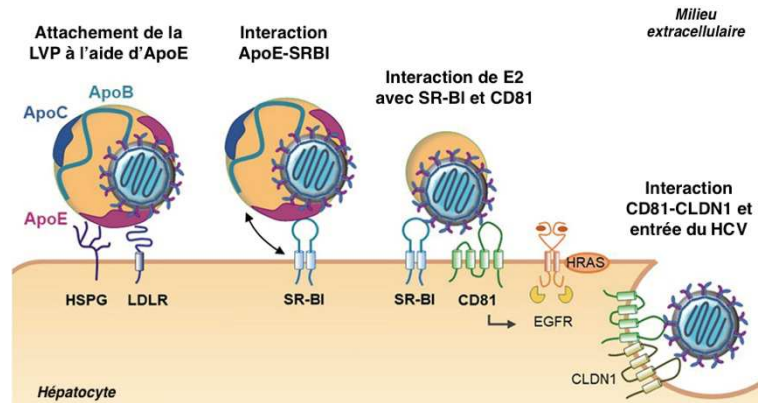


Figure 7 : Attachement et entrée du HCV. L'attachement de la LVP à la surface des hépatocytes nécessite ApoE qui interagit avec les héparanes sulfates à protéoglycane (HSPG) et le récepteur des lipoprotéines de basse densité (LDLR). La LVP interagit ensuite avec SR-BI (*Scavenger Receptor Class B, Member 1*) à l'aide d'ApoE. Cette interaction permet de libérer E2 qui interagit avec SR-BI et CD81, activant la voie de signalisation de EGFR (*Epidermal growth factor receptor*). L'activation d'EGFR induit l'interaction entre CD81 et Claudin-1 (CLDN1) déclenchant l'entrée de la LVP par endocytose (adapté de Wrensch *et al.*, 2018).

Le réarrangement lipoprotéique de la LVP permet l'interaction d'un épitope de E2 à la tétraspanine CD81, le premier récepteur du HCV identifié (Pileri *et al.*, 1998). L'interaction spécifique de CD81 avec la glycoprotéine E2 est un déterminant de la spécificité d'espèce du HCV (Dorner *et al.*, 2013; Ploss *et al.*, 2009). L'interaction E2-CD81 induit une activation d'EGFR (*Epidermal growth factor receptor*) et de la GTPase HRas ainsi que de leur voie de signalisation, permettant une translocation du complexe LVP-CD81 vers les jonctions serrées (Figure 7) (Brazzoli *et al.*, 2008; Lupberger *et al.*, 2011; Zona *et al.*, 2013). Au niveau des jonctions serrées, les facteurs d'entrée CLDN1 (Claudin-1) et OCLN (Occludine), dits tardifs, permettent l'internalisation des virions. L'importance d'OCLN dans l'entrée du HCV a été identifiée il y a une dizaine d'années, puis confirmée en culture cellulaire et en modèle animal plus récemment, cependant son rôle dans l'entrée reste largement méconnu (Ploss *et al.*, 2009; Shimizu *et al.*, 2018; Shirasago *et al.*, 2016). A l'instar de CD81, OCLN est un déterminant

d'espèce du HCV (Ploss *et al.*, 2009). Contrairement à OCLN, la localisation de CLDN1 au niveau des jonctions serrées est nécessaire pour l'infection par le HCV (Liu *et al.*, 2009a; Yang *et al.*, 2008). Après migration de CD81 et de la LVP induite par l'activation d'EGFR, CD81 forme un complexe avec CLDN1 induisant l'endocytose clathrine-dépendante du complexe HCV-CD81-CLDN1 (Coller *et al.*, 2009; Farquhar *et al.*, 2012; Krieger *et al.*, 2010). Le virus est endocyté dans un endosome précoce dont l'environnement acide est nécessaire à la fusion membranaire permettant la libération du génome viral dans le cytoplasme cellulaire (Meertens *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2011; Tscherne *et al.*, 2006). Le mécanisme de fusion membranaire est encore largement méconnu. Bien que le rôle d'E2 dans la fusion membranaire ait été suggéré depuis plusieurs années (Chi *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2011), des études plus récentes montrent qu'E1 est également fortement impliquée dans cette étape (Tong *et al.*, 2017, 2018).

b. Traduction de la polyprotéine virale

Une fois libéré dans le cytoplasme, le génome du HCV est reconnu par la machinerie traductionnelle cellulaire. L'extrémité 5' de l'ARN génomique du HCV est dépourvue de coiffe pourtant nécessaire à l'initiation de la traduction par recrutement du facteur eIF4E. Elle forme une structure tertiaire complexe agissant comme un IRES. La reconnaissance de l'IRES par le ribosome conduit à l'initiation de la traduction du HCV. Cette traduction est différente de l'initiation canonique coiffe-dépendante.

i. Initiation canonique de la traduction des ARNm eucaryotes

L'initiation de la traduction des ARNm eucaryotes classiques dépend d'une coiffe, correspondant à une guanine méthylée en position 7 du ribose suivie d'une liaison triphosphate. Ce processus hautement régulé fait intervenir au moins 9 facteurs d'initiation de la traduction eIF (*Eukaryotic initiation factor*). La sous-unité 40S du ribosome recrute les facteurs eIF1, eIF1A, eIF3, eIF5 et le complexe trimérique eIF2-GTP-Met-ARNt^{Met}, formant le complexe 43S (**Figure 8**). La région 5' des ARNm cellulaires est très souvent structurée, empêchant le recrutement direct du complexe 43S. C'est le complexe trimérique eIF4F, formé de eIF4A, eIF4E et eIF4G qui permet le recrutement du complexe 43S. Le facteur eIF4E reconnaît la coiffe en 5' de l'ARNm. Le facteur eIF4A comporte un domaine hélicase, donc la fonction est accrue par le facteur eIF4G, permettant l'ouverture des structures secondaires présentes en 5' de l'ARNm. Enfin, l'interaction entre eIF4G et eIF3 permet le recrutement du

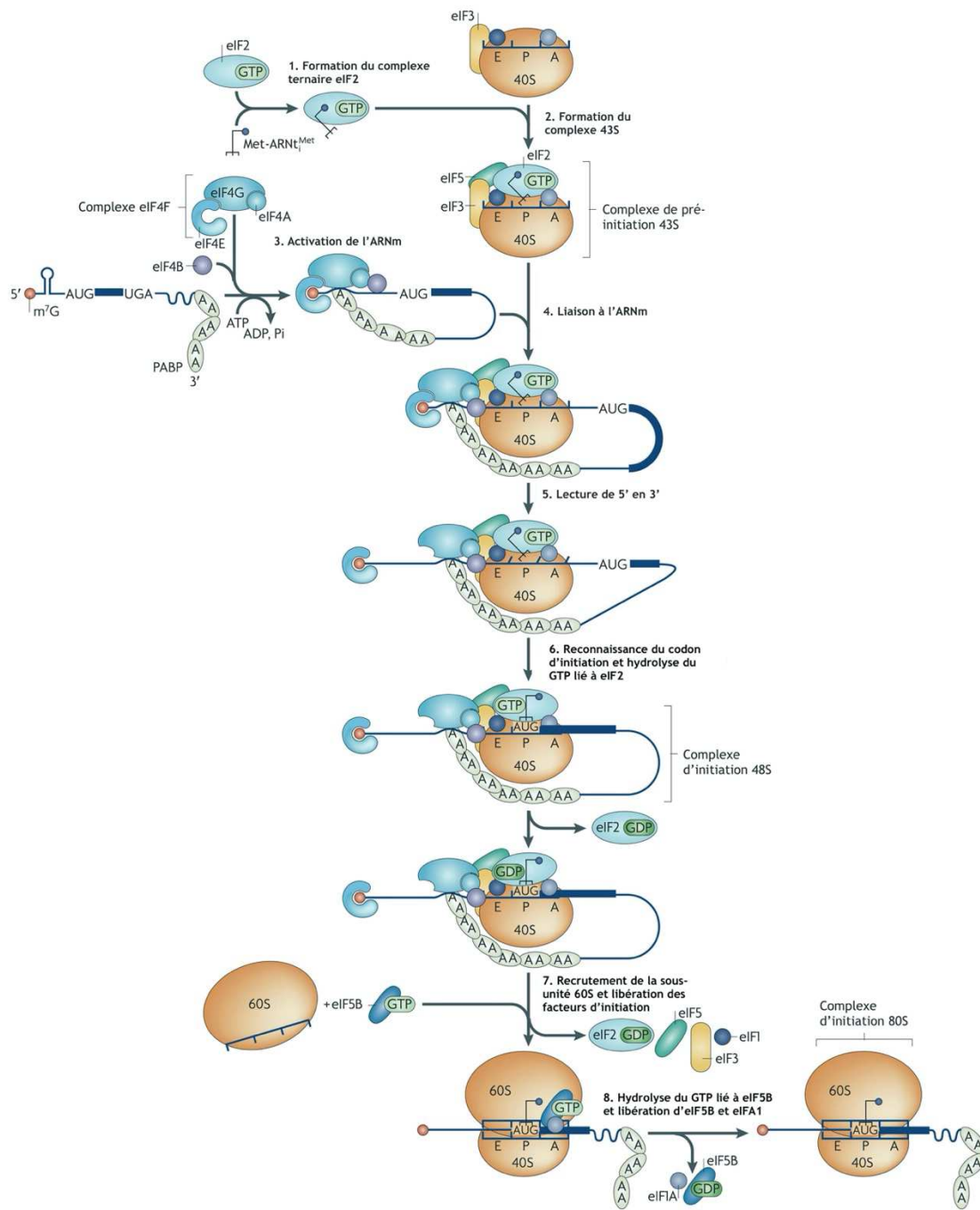


Figure 8 : Modèle canonique de l'initiation de la traduction eucaryote. L'initiation canonique de la traduction chez les organismes eucaryotes est divisée en huit étapes. (1) Formation du complexe ternaire comprenant *eukaryotic initiation factor 2* (eIF2)-GTP-Met-ARNt^{Met}. (2) Formation du complexe de pré-initiation 43S comprenant la petite sous-unité ribosomique 40S, eIF1, eIF1A, eIF3, eIF2-GTP-Met-ARNt^{Met} et eIF5. (3) Les structures secondaires de l'ARNm sont ouvertes par l'activité hélicase d'eIF4A permettant l'activation de l'ARNm. (4) Le complexe eIF4F recrute le complexe 43S sur l'ARNm. (5) La région 5' UTR est lue de 5' en 3' par le complexe 43S. (6) Lorsque le codon d'initiation est reconnu, le complexe 43S adopte une conformation fermée induisant la libération d'eIF1 et l'hydrolyse par eIF5 du GTP lié à eIF2, formant le complexe 48S. (7) La sous-unité ribosomique 60S est recrutée et interagit avec le complexe 43S grâce à l'action d'eIF5B, induisant la libération des facteurs eIF1, eIF3, et eIF5. (8) L'hydrolyse du GTP lié à eIF5B induit la libération d'eIF1A et eIF5B-GDP ainsi que la formation du complexe d'initiation 80S compétent pour la traduction (adapté de Jackson *et al.*, 2010).

complexe 43S au niveau de l'ARNm. Une fois recruté, le complexe 43S parcourt la région 5' de l'ARNm afin de trouver le codon AUG initiateur qui est reconnu par interaction avec l'anticodon du Met-ARNt^{Met_i}. La reconnaissance du codon AUG initiateur induit l'hydrolyse par eIF5 du GTP porté par eIF2. Les facteurs eIF1, eIF3 et eIF5 sont ensuite libérés du complexe 43S, permettant le recrutement de la grande sous-unité ribosomique 60S et du facteur eIF5B lié au GTP. L'hydrolyse du GTP permet le relargage d'eIF1A et d'eIF5B et la formation du complexe ribosomique 80S compétent pour la traduction (Jackson *et al.*, 2010).

ii. Initiation de la traduction IRES-dépendante du HCV

La région 5' UTR du HCV comporte un IRES formé par 3 domaines distincts se structurant en tige-boucles permettant le recrutement de la machinerie traductionnelle directement au niveau du codon AUG initiateur, faisant partie du domaine IV. La partie centrale de l'IRES du HCV est une jonction à quatre voies composée des tiges-boucles IIIId, IIIe, IIIf et IV (Wang *et al.*, 1995). Celle-ci forme une structure en double pseudo-nœuds et ressemble à une structure d'ARNt (ARN de transfert) (Nadal *et al.*, 2002). Le centre de l'IRES du HCV permet le recrutement direct de la sous-unité ribosomique 40S sans présence d'aucun autre facteur d'initiation de la traduction (Kieft *et al.*, 2001; Pestova *et al.*, 1998). La sous-unité ribosomique nécessite la présence des facteurs eIF2, eIF3 et eIF5 formant alors le complexe 43S nécessaire au recrutement de la sous-unité 60S et à l'initiation de la traduction (**Figure 9**). Le facteur eIF3 est nécessaire car il interagit à la fois avec la sous-unité ribosomique 40S (Jackson *et al.*, 2010) et avec la partie apicale du domaine III de l'IRES du HCV (Buratti *et al.*, 1998; Sizova *et al.*, 1998). Comme pour une initiation de la traduction classique, eIF2 permet d'apporter l'ARNt initiateur et eIF5 fournit l'activité GTPase nécessaire à la reconnaissance du codon initiateur par le complexe eIF2-GTP-Met-ARNt^{Met_i} (Pestova *et al.*, 1998). De ce fait, la présence de ces 3 facteurs d'initiation de la traduction est suffisante au recrutement et au positionnement de la sous-unité ribosomique 40S au niveau du codon AUG initiateur permettant la formation du complexe 43S. Le facteur eIF5B-GTP est recruté avec la grande sous-unité ribosomique 60S. L'hydrolyse du GTP d'eIF5B permet la libération des différents eIF ainsi que la formation du complexe ribosomique 80S compétent pour la traduction (Locker *et al.*, 2007; Pestova *et al.*, 2008; Terenin *et al.*, 2008). Contrairement à la traduction classique, le facteur eIF3 reste associé au complexe ribosomique 80S (Weinlich *et al.*, 2009).

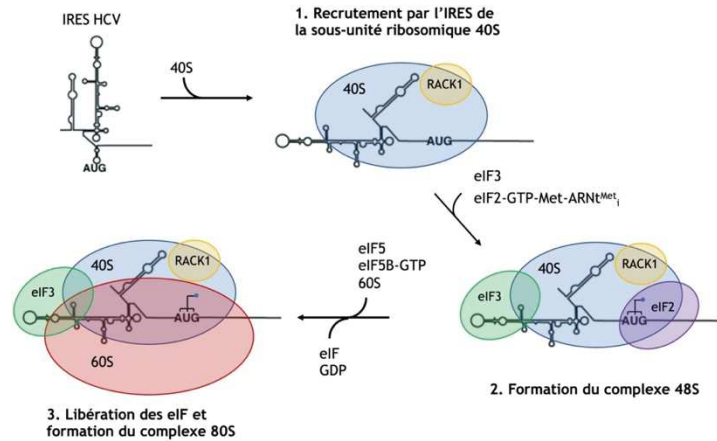


Figure 9 : Initiation de la traduction IRES-dépendante du HCV. L'IRES du HCV permet le recrutement direct de la petite sous-unité ribosomique 40S associée à RACK1. Le facteur eIF3 interagit ensuite avec la région apicale du domaine III de l'IRES et le complexe eIF2-GTP-Met-ARNt^{Met}, est recruté formant le complexe 48S. Le recrutement d'eIF5 et eIF5B-GTP ainsi que de la grande sous-unité ribosomique 60S permet la formation du complexe 80S par hydrolyse du GTP d'eIF5B et de la libération des différents eIF, à l'exception d'eIF3 (adapté de Lukavsky, 2009).

iii. Les ITAF

En plus de ces facteurs d'initiation de la traduction, la traduction IRES-dépendante du HCV nécessite la présence de facteurs agissant en *trans* (ITAF – *IRES trans-acting factor*). Plusieurs protéines cellulaires n'étant pas impliquées dans la traduction classique des ARNm ont été décrites comme importantes pour l'initiation de la traduction du HCV. Plusieurs ITAF sont recrutés directement par le génome du HCV, parmi lesquels la protéine La, NSAP1, hnRNP L et D, IMP1, PCBP2 et le complexe Lsm1-7 (Niepmann & Gerresheim, 2020). Les protéines La et PCBP2 (*Poly(rC) binding protein 2*) possèdent plusieurs domaines de liaison à l'ARN du HCV et forment des oligomères (Bedard *et al.*, 2004; Craig *et al.*, 1997). Cette particularité leur permettrait de servir de chaperonnes pour stabiliser une structure tertiaire de l'ARN nécessaire à la traduction. L'un des sites d'interaction de la protéine La se trouve au niveau du domaine IV de l'IRES en amont du codon AUG initiateur et pourrait aider à ouvrir la tige-boucle afin de positionner correctement l'AUG au niveau de la sous-unité ribosomique 40S (Ali & Siddiqui, 1997; Ali *et al.*, 2000; Martino *et al.*, 2012; Pudi *et al.*, 2004). NSAP1 (*NS1 associated protein 1*) permet également le bon positionnement du codon AUG initiateur en se liant à une région riche en adénosine en aval de celui-ci (Kim *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2011).

L'initiation de la traduction IRES-dépendante du HCV est également stimulée par d'autres protéines ne se liant pas à l'ARN. Il y a quelques années, notre laboratoire a montré que les protéines MKNK1 et PI4K-beta sont des régulateurs positifs de la traduction du HCV

de par leur activité kinase (Lupberger *et al.*, 2015). Notre laboratoire a également caractérisé RACK1 (*Receptor for activated C kinase 1*) comme étant impliquée dans la traduction IRES-dépendante de plusieurs virus, dont le HCV et le CrPV (*Cricket Paralysis Virus*) (Majzoub *et al.*, 2014). RACK1 est une protéine pouvant interagir avec plusieurs protéines impliquées dans des voies de signalisation (revue dans la partie « RACK1 », page 53). Elle peut également interagir avec la sous-unité ribosomique 40S dans une région proche de l'entrée et de la sortie du canal de l'ARNm et adjacente à la région liée par l'IRES du HCV (Johnson *et al.*, 2019). C'est sous sa forme ribosomique que RACK1 est nécessaire pour la traduction IRES-dépendante du HCV et du CrPV (Majzoub *et al.*, 2014).

iv. Le miR-122

Le miR-122 est le micro ARN (miR) le plus exprimé dans le foie et est un régulateur de la physiologie hépatique (Bandiera *et al.*, 2015). Il a été décrit comme un facteur d'hôte favorisant la traduction et la réplication du HCV (Jopling *et al.*, 2005; Schult *et al.*, 2018). De ce fait, il contribue à renforcer le tropisme hépatique du HCV. La région 5' UTR du génome du HCV comporte 2 sites de liaisons au miR-122 entre les domaines I et II (Jopling *et al.*, 2008). En l'absence de miR-122, la structure secondaire prédite du domaine II change drastiquement, masquant alors les sites de liaison au miR-122 et empêchant l'initiation de la traduction (Schult *et al.*, 2018). Le rôle du miR-122 est d'assister et de stabiliser le repliement de l'IRES afin de permettre une bonne conformation du domaine II et ses interactions avec le domaine IV et la sous-unité ribosomique 40S. Dans leur voie de biogenèse, les miR sont chargés par la protéine Ago2 afin de pouvoir reconnaître leur séquence cible (Svoboda, 2015). De ce fait, le miR-122 se lie au génome du HCV en complexe avec Ago2. Le génome du HCV étant dépourvu de coiffe, il est sensible à la dégradation par les exonucléases cellulaires. La présence d'Ago2 protège l'extrémité 5' de l'ARN viral des exonucléases et ralentit également sa dégradation (Shimakami *et al.*, 2012). La liaison du miR-122 à l'extrémité 5' du génome du HCV permet donc à la fois de stimuler la traduction de la polyprotéine virale et de protéger l'ARN d'une dégradation prématurée par les mécanismes de défense cellulaires.

c. Réplication du génome viral

i. La machinerie de réplication virale

La polyprotéine virale synthétisée est maturée de manière co-translationnelle par des protéases virales et cellulaires donnant naissance à 3 protéines structurales (Core, E1 et E2) et 7 protéines non-structurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) jouant un rôle dans la réplication du génome viral et l'assemblage des nouveaux virions (Moradpour & Penin, 2013). Après maturation de la polyprotéine virale, toutes les protéines non-structurales, à l'exception de p7 et de NS2, sont impliquées dans la réplication du génome viral. La protéase NS2 n'est pas directement impliquée dans la réplication mais la maturation par clivage de NS2/NS3 qu'elle réalise est une des étapes limitantes de la formation du complexe de réplication (Madan *et al.*, 2014).

NS3 possède deux activités enzymatiques. Son domaine N-terminal contient un domaine protéase à sérine activé par interaction avec son co-facteur NS4A et impliqué dans la maturation par clivage de la polyprotéine virale (**Figure 10**) (Tabata *et al.*, 2020). Le domaine C-terminal porte une fonction hélicase impliquée dans la réplication virale. Des mutations dans le domaine hélicase ont montré une corrélation de l'activité répliquative du HCV avec la puissance de l'activité hélicase (Stross *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2018). Le rôle précis du domaine hélicase de NS3 dans la réplication n'est cependant pas connu. Il pourrait être impliqué dans l'ouverture des nombreuses structures secondaires présentes, mais également dans la séparation de l'ARN double-brin résultant de la réplication (Morikawa *et al.*, 2011).

NS4A est une petite protéine transmembranaire ne possédant pas de fonction enzymatique. Elle forme des homodimères permettant d'ancrer NS3, qui ne possède pas de domaine transmembranaire, dans la membrane du RE et sert de co-facteur pour ses fonctions protéase et hélicase nécessaires à la réplication du HCV (**Figure 10**) (Kohlway *et al.*, 2014). De plus, NS4A est un déterminant de l'hyperphosphorylation de NS5A régulant le passage de la réplication à l'assemblage des particules virales (Lindenbach *et al.*, 2007). NS4A dirige également le complexe NS3-4A vers les membranes mitochondriales ou dans des régions du RE proches des mitochondries, permettant le clivage de MAVS (*Mitochondrial antiviral-signaling protein*) et l'inhibition de la réponse interféron (IFN) (Horner *et al.*, 2011; Meylan *et al.*, 2005).

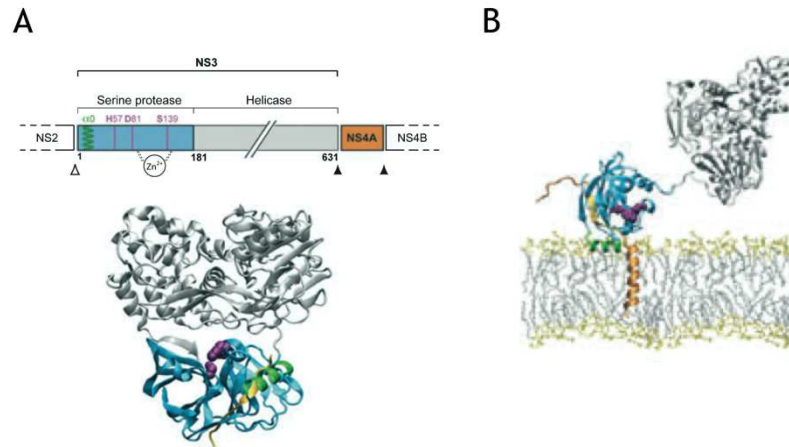


Figure 10 : Structure et association membranaire du complexe NS3-4A. (A) Les domaines protéase à sérine (bleu) et hélicase (gris) de NS3 sont représentés au niveau de la séquence et de la structure 3D. Les sites actifs de la protéase sont représentés en violet et l'hélice α -amphipathique située en N-terminal est en vert. Un ion Zn^{2+} permet de stabiliser la structure de la protéase. La protéine NS4A est représentée en orange. Le site de clivage de NS2 est représenté par la flèche blanche et les sites de clivage en *cis* et en *trans* réalisés par NS3-4A sont indiqués par les flèches noires. (B) Représentation 3D de la structure de NS3-4A ancrée dans la membrane du RE. La protéine NS4A (orange) est entièrement transmembranaire. Le domaine protéase à sérine est ancré au niveau de la membrane du RE par NS4A (adapté de Morikawa *et al.*, 2011).

NS4B est une protéine intégralement transmembranaire avec une conformation complexe. Elle possède 2 hélices amphipathiques en N-terminal (AH1-2) suivies de 4 domaines transmembranaires (TM1-4) puis de 2 hélices α (H1-2) en C-terminal (**Figure 11**) (Gouttenoire *et al.*, 2010). La conformation de AH1-2 peut subir une modification post-traductionnelle. L'oligomérisation de AH2 pourrait induire son insertion dans la membrane du RE et déplacer AH1 du cytosol à la lumière du RE (Gouttenoire *et al.*, 2009). Cependant, ce phénomène semble être dynamique puisque la co-expression de NS4B et NS5A favorise l'orientation cytosolique de la partie N-terminale de NS4B (Lundin *et al.*, 2006). L'infection par le HCV induit une déformation des membranes du RE formant un réseau membranaire servant de support à la réplication virale (Egger *et al.*, 2002; Miyanari *et al.*, 2007; Romero-Brey *et al.*, 2012). NS4B est impliquée dans la formation de ce réseau membranaire par interaction avec elle-même (Paul *et al.*, 2011) et avec des protéines cellulaires telles que PREB (*Prolactin regulatory element binding protein*) (Kong *et al.*, 2016). De plus, l'interaction de AH1-2 avec les gouttelettes lipidiques pourrait favoriser la formation du réseau membranaire (Tanaka *et al.*, 2013). Cependant, ces mécanismes restent encore largement méconnus. NS4B est également nécessaire à la réplication virale par son interaction avec d'autres protéines virales. Son interaction avec NS3 semble importante pour la réplication virale (Paredes & Blight, 2008).

Introduction – Partie I

Elle interagit également avec NS5A pour induire sa bonne localisation ainsi qu'une régulation de son état d'hyperphosphorylation, tous deux importants pour la réplication virale (Biswas *et al.*, 2016; David *et al.*, 2015).

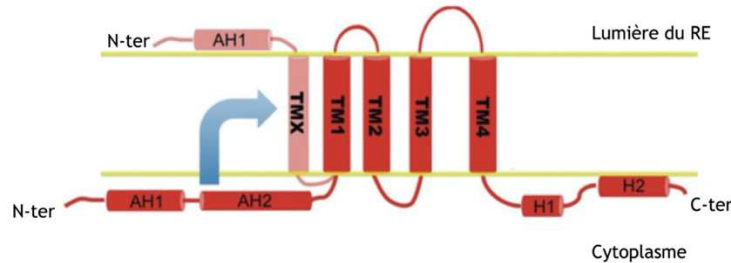


Figure 11 : Représentation schématique de la structure et de la topologie de NS4B. Les différents domaines de NS4B sont représentés : les deux hélices α -amphipathiques en N-terminal (AH1-2), les 4 domaines transmembranaires (TM1-4) et les deux hélices α (H1-2) en C-terminal. La structure de NS4B est dynamique et l'hélice AH2 peut s'insérer dans la membrane du RE formant un domaine transmembranaire supplémentaire (TMX) et induit une orientation de l'extrémité N-terminale vers la lumière du RE (adapté de Li *et al.*, 2012b).

NS5A est une phosphoprotéine impliquée dans différentes étapes du cycle viral et dans le passage de l'une à l'autre, bien qu'elle ne possède aucune fonction enzymatique. Son extrémité N-terminale est caractérisée par une hélice amphipathique (AH) permettant son ancrage dans la membrane du RE et est également essentielle à la réplication virale (Penin *et al.*, 2004). Elle contient ensuite 3 domaines (DI-III) reliés entre eux par des séquences de faible complexité (**Figure 12A**). La structure cristallographique du DI montre que celui-ci forme un dimère, chaque molécule étant capable de lier un atome de zinc, cependant deux dimères différents ainsi qu'un multimère de NS5A ont été observés (**Figure 12B**) (Lambert *et al.*, 2014; Love *et al.*, 2009; Tellinghuisen *et al.*, 2005). Ceci donne un potentiel électrostatique à l'interface des deux molécules leur conférant la capacité de lier de l'ARN simple brin (**Figure 12C**) (Tellinghuisen *et al.*, 2005). Le DI interagit avec l'extrémité 3' des ARN génomique et antigénomique du HCV lors de la réplication virale (Huang *et al.*, 2005). De plus, ce domaine est impliqué dans la formation du réseau membranaire nécessaire à la réplication (Romero-Brey *et al.*, 2015). Les deux autres domaines sont dispensables pour la réplication virale à l'exception de quelques acides aminés de l'extrémité C-terminale du DII (Tellinghuisen *et al.*, 2008a). Le DIII interagit avec la protéine Core au niveau des gouttelettes lipidiques afin de permettre l'assemblage des nouvelles particules virales (Appel *et al.*, 2008). Les différentes fonctions de NS5A semblent être régulées par l'existence de NS5A sous deux formes :

phosphorylée et hyperphosphorylée. Leur existence a été montrée pour la première fois par l'observation de deux phospho-isoformes de NS5A après séparation par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) (Kaneko *et al.*, 1994). Différentes kinases cellulaires peuvent phosphoryler NS5A, dont l'une est CKI- α (*Casein kinase I- α*) qui phosphoryle des résidus sérines du DIII ainsi que de la première séquence de faible complexité (LCS1) comprise entre les DI et DII (Masaki *et al.*, 2014; Tellinghuisen *et al.*, 2008b). La phosphorylation du DIII correspond à la forme de phosphorylation basale de NS5A, tandis que la phosphorylation de LCS1 correspond à la forme hyperphosphorylée. La phosphorylation de NS5A est nécessaire à la réplication. Cependant, le passage à la forme hyperphosphorylée contribue à une augmentation de la concentration de NS5A au niveau des gouttelettes lipidiques, diminuant la réplication et favorisant l'assemblage de nouvelles particules virales (Masaki *et al.*, 2014). Cependant, la découverte récente de plusieurs motifs différents d'hyperphosphorylation de NS5A, et notamment la présence de thréonines phosphorylées, montre qu'il pourrait exister différentes formes de NS5A hyperphosphorylées dont les fonctions distinctes sont pour le moment inconnues (Schenk *et al.*, 2018).

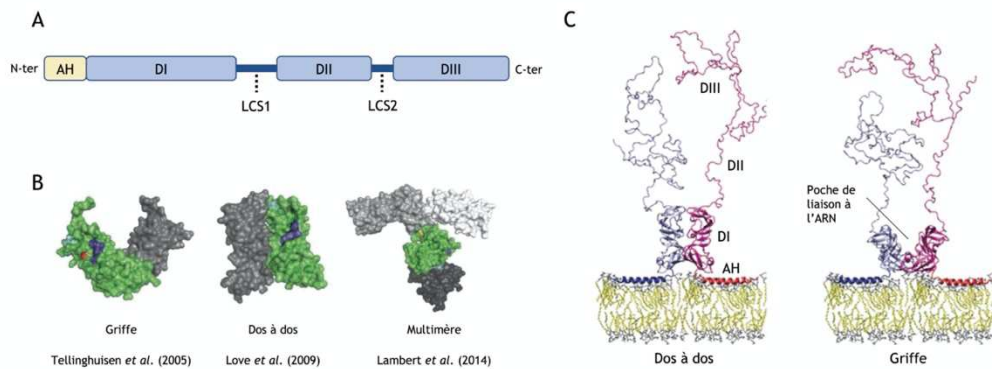


Figure 12 : Représentation schématique de l'organisation des domaines de NS5A et de la structure du dimère. (A) Les différents domaines de NS5A sont représentés : l'hélice α -amphipathique en N-terminal ainsi que les trois domaines (DI-III) reliés entre eux par des séquences de faible complexité (LCS1-2). (B) Les deux types de dimères (en griffe ou dos à dos) ainsi que le multimère de NS5A observés par cristallographie sont représentés (adapté de Ross-Thriepland & Harris, 2015). (C) Structure 3D de deux dimères de NS5A associés à la membrane du RE. Contrairement au DI qui est très structuré, les domaines DII et DIII sont intrinsèquement dépliés et interagissent avec plusieurs protéines cellulaires et virales. Dans la structure en griffe, la poche comprise entre les deux domaines DI permet la liaison à l'ARN (adapté de Rupp & Bartenschlager, 2014).

Introduction – Partie I

NS5B est l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) virale catalysant la réplication du génome du HCV. Elle est ancrée dans la membrane du RE par un court domaine transmembranaire formé par les 21 acides aminés de l'extrémité C-terminale, orientant le site catalytique vers le cytoplasme (Schmidt-Mende *et al.*, 2001). La grande majorité N-terminale constitue le domaine catalytique, suivi d'un domaine *linker*. Le domaine transmembranaire n'est pas nécessaire à l'activité catalytique de NS5B *in vitro*, mais il est nécessaire à la réplication du HCV en adressant NS5B au niveau du site de réplication situé dans le réseau membranaire (Lee *et al.*, 2004b). A l'instar de toutes les RdRp virales, NS5B adopte une forme en « main droite » avec des domaines correspondant à la paume, au pouce et aux doigts (Figure 13) (Sesmero & Thorpe, 2015). De plus, elle possède un domaine « β -flap » spécifique des RdRp des virus appartenant à la famille des *Flaviviridae*. Plusieurs études ont montré que NS5B n'interagissait pas spécifiquement avec le génome du HCV mais qu'elle peut également se lier à la région 3'UTR d'ARNm cellulaires, menant à l'hypothèse que NS5B peut également amplifier des ARN de l'hôte (Yu *et al.*, 2012b; Yuhashi *et al.*, 2014). Cependant, la combinaison des interactions entre NS3, NS5A et NS5B, nécessaires à la réplication virale (Binder *et al.*, 2007), et l'ancrage de NS5B au niveau des membranes du réseau membranaire, limitant l'accès aux ARN cellulaires, apportent la spécificité de réplication du génome du HCV.

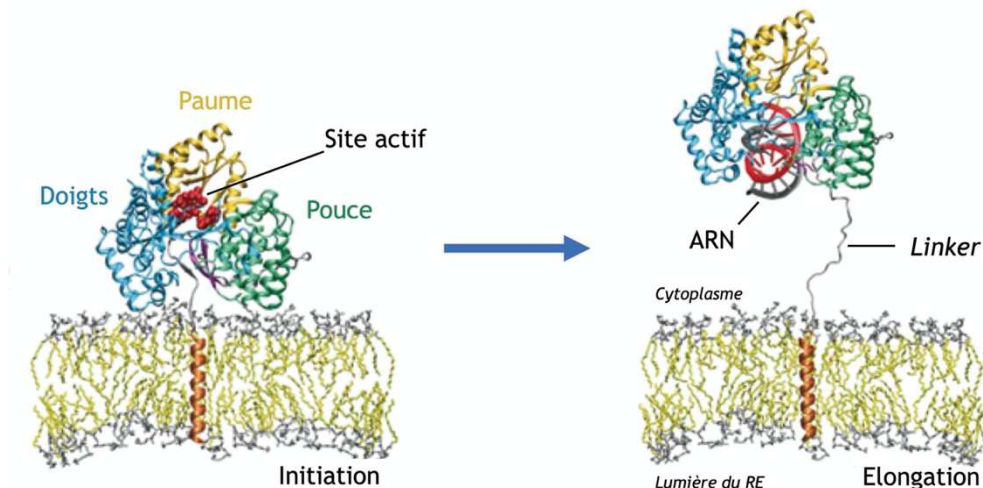


Figure 13 : Représentation schématique de la structure 3D de NS5B. Durant l'étape d'initiation (gauche) NS5B est en conformation fermée. La structure en forme de main droite est représentée avec les doigts, la paume et le pouce. Le site actif de l'enzyme est indiqué par la présence de deux nucléotides d'amorce (rouge). Lors de l'élongation, NS5B adopte une structure ouverte. Un modèle hypothétique de cette structure est représenté (droite) où le relâchement du *linker* induit par le passage à l'élongation permet l'adoption de cette structure (adapté de Rupp & Bartenschlager, 2014).

ii. La réplication du HCV

La première étape de la réplication du HCV passe par la synthèse d'un ARN antigénomique utilisant l'ARN génomique comme matrice. Celle-ci peut être décomposée en 4 phases : la liaison à l'ARN, l'initiation, l'élongation et la terminaison. Bien qu'*in vitro* NS5B soit capable d'initier son activité par un mécanisme utilisant des amorces (Behrens *et al.*, 1996; Lohmann *et al.*, 1997), elle utilise un mécanisme d'initiation *de novo* dans les cellules infectées (Luo *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 2000). NS5B est d'abord dans une formation dite fermée où les domaines *linker* et β -*flap* bloquent le site catalytique (Figure 13) (Mosley *et al.*, 2012). Elle reconnaît alors l'extrémité 3' de l'ARN du HCV et synthétise un premier di-nucléotide (Ferrari *et al.*, 2008). Le passage de l'initiation à l'élongation nécessite la présence de GTP induisant un changement de conformation de NS5B, alors dite ouverte, permettant l'ouverture du site catalytique et la synthèse du brin d'ARN complémentaire (Harrus *et al.*, 2010; Scrima *et al.*, 2012). L'extrémité 3' UTR de l'ARN génomique est beaucoup moins accessible aux facteurs de réplication que celle de l'ARN antigénomique. Ceci induit une initiation de la réplication à partir de l'ARN antigénomique 10 fois plus efficace qu'à partir de l'ARN génomique (Smith *et al.*, 2002). Par ce biais, le HCV permet la régulation de sa réplication, avec une synthèse largement accrue d'ARN génomique dont il a besoin pour la traduction des protéines virales et l'assemblage de nouveaux virions.

La réplication virale nécessite la présence d'éléments régulateurs présents au sein du génome ainsi que leur interaction. Les interactions les mieux décrites concernent les tige-boucles présentes dans le domaine X de la région 3' UTR avec des tige-boucles se situant dans la région codante de NS5B. Environ 90 nucléotides en amont de la région 3' UTR, une tige-boucle appelée 5BSL3.2 a été caractérisée comme un élément nécessaire à la réplication agissant en *cis* (CRE – *cis-replication element*) (Figure 5). Un renflement présent au niveau de la tige interagit avec une séquence environ 200 nucléotides en amont (Fricke *et al.*, 2015). L'inhibition de cette interaction par mutation est délétère pour la réplication virale (Chu *et al.*, 2013). Une interaction à longue distance a également été observée entre les parties apicales des boucles de 5BSL3.2 et de SL3 présentes dans le domaine X de la région 3' UTR. Cette interaction ainsi que la conservation des séquences nucléotidiques des deux parties apicales interagissant sont nécessaires à la réplication virale (Friebe *et al.*, 2005; You & Rice, 2008). L'importance de 5BSL3.2 dans la réplication virale est notamment liée au fait que NS5B

interagit avec cette région avec une affinité aussi forte que pour la région 3' UTR (Lee *et al.*, 2004a). L'étude du rôle de la région 3' de l'ARN antisens du HCV dans la régulation de la réplication virale est plus difficile, car l'introduction de mutations dans un système réplcatif nécessite de muter la région 5' UTR du HCV pouvant alors altérer la traduction ou la première étape de la réplication permettant la synthèse de l'ARN antisens. De plus, la structure secondaire n'est pas totalement définie et trois variants ont été proposés (Dutkiewicz *et al.*, 2008; Schuster *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2002). Il est cependant défini que la présence des différentes tige-boucles est déterminante et nécessaire à la réplication virale (Friebe & Bartenschlager, 2009).

A l'instar des autres virus dont le génome est un ARN de polarité positive comme le virus de la dengue (Welsch *et al.*, 2009) ou le Poliovirus (Belov *et al.*, 2012) la réplication virale a lieu dans un réseau membranaire, ici formé de membranes dérivées du RE dont la formation est stimulée par des protéines du HCV (Jackson *et al.*, 1979; Shimizu, 1992). Le rôle de ce réseau membranaire est à la fois de former des usines virales concentrant dans l'espace les différents facteurs cellulaires et viraux nécessaires à la traduction, la réplication et l'assemblage des nouveaux virions, ainsi que de protéger les composants viraux des mécanismes de défense antiviraux (Harak & Lohmann, 2015). Contrairement aux Flavivirus qui forment des vésicules invaginées dans le RE, le HCV forme des vésicules à double membrane (DMV – *double-membrane vesicle*) ressemblant à celles formées par les Picornavirus et les Coronavirus (**Figure 14**) (Paul & Bartenschlager, 2013).

In vitro, l'expression seule de NS5A est capable d'induire la formation de DMV dans une faible mesure (Egger *et al.*, 2002; Romero-Brey *et al.*, 2012). Ce phénomène est amplifié par l'expression de la partie NS3-NS5B de la polyprotéine virale. Différentes études par mutations ont montré que les domaines des protéines virales importants pour la formation des DMV sont le domaine hélicase de NS3, les motifs *glycine zipper* de NS4B et le domaine 1 de NS5A ainsi que sa partie N-terminale ancrée dans la membrane du RE (Paul *et al.*, 2018; Romero-Brey *et al.*, 2015). NS4B forme des complexes oligomériques, par interactions de plusieurs protéines NS4B entre-elles au niveau de leurs motifs *glycine zipper*, nécessaires à la formation d'usines virales fonctionnelles (Gouttenoire *et al.*, 2010; Paul *et al.*, 2011, 2018). De plus, les hélices α -amphipathiques présentes en N- et C-terminal de NS4B induisent des modifications topologiques et altèrent les propriétés des membranes (Palomares-Jerez *et al.*,

2012, 2013). NS5A possède également une hélice α -amphipathique en N-terminal dont l'insertion dans une seule couche membranaire induit des altérations des membranes *in vitro* (Palomares-Jerez *et al.*, 2010).

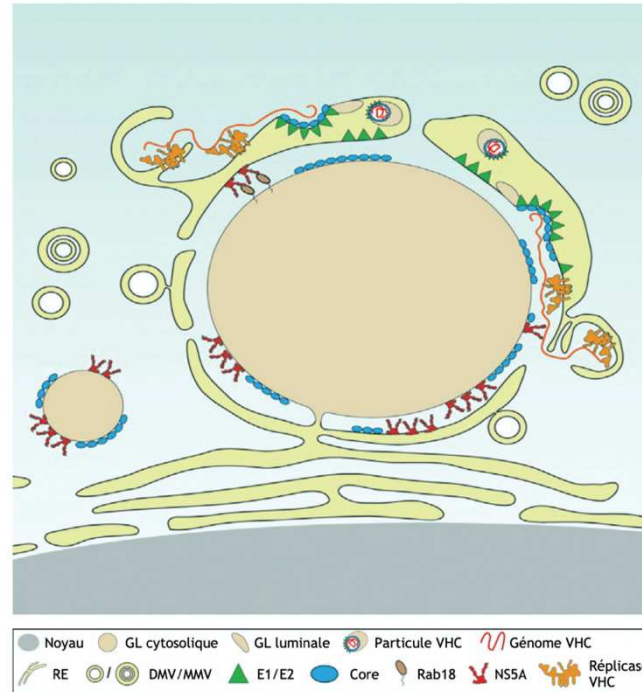


Figure 14 : Représentation schématique du modèle de la réplique et de l'assemblage des particules virales. L'infection par le HCV induit une déformation des membranes du réticulum endoplasmique (RE) et la formation de vésicules à double membrane (DMV) et à membranes multiples (MMV). Les membranes du RE contiennent les protéines structurales du HCV. Elles sont enroulées autour d'une gouttelette lipidique (GL) et interconnectées avec les DMV où la réplicase du HCV réplique le génome viral. Le génome du HCV est acheminé par des oligomères de Core jusqu'à la membrane du RE où sont enchâssées les glycoprotéines virales E1/E2. Le virion bourgeonne au niveau de la membrane du RE et s'associe aux lipoprotéines de très basse densité contenues dans les GL lumineuses avant d'être sécrété (adapté de Lee *et al.*, 2019b).

En plus de l'altération de la topologie des membranes, l'infection par le HCV induit une modification de leur composition lipidique, par l'action de protéines cellulaires, afin d'induire la formation des DMV. NS5A induit une relocalisation de PI4KA (*Phosphatidylinositol 4-kinase III α*) vers les membranes du RE et stimule son activité kinase et la production de phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) qui s'insère ensuite dans la membrane des DMV (Bianco *et al.*, 2012; Reiss *et al.*, 2011). NS5A interagit également avec OSBP (*Oxysterol binding protein*) et induit son recrutement au réseau membranaire de manière dépendante à PI4KA (Amako *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2014). OSBP enrichit les membranes du réseau membranaire en cholestérol, favorisant leur intégrité nécessaire à la réplique virale. La formation de ce

complexe est favorisée et stabilisée par l'interaction de VAP-A (*Vesicle-associated membrane protein-associated protein A*) avec NS5A et OSBP (Amini-Bavil-Olyaei *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2004). La présence de cholestérol au site de réplication virale est également assurée par la protéine NPC1 (*Niemann-Pick-type C1*), permettant le transport du cholestérol depuis les endosomes tardifs vers le réseau membranaire (Stoeck *et al.*, 2018).

d. Assemblage et export du HCV

Après la réplication, les dernières étapes du cycle viral nécessitent les protéines structurales Core, E1 et E2 permettant le bourgeonnement des particules virales dans le RE. Le recrutement des protéines structurales ainsi que l'encapsidation du génome viral sont finement régulés dans le temps et dans l'espace. Les particules virales néoformées empruntent la voie de sécrétion cellulaire où elles interagissent avec les apolipoprotéines, nécessaires à la formation de la LVP, avant d'être libérées par exocytose (Gastaminza *et al.*, 2008). Ce processus hautement régulé fait jouer de concert des protéines non structurales du HCV ainsi que des facteurs d'hôtes.

i. Les mouvements de Core

Les DMV servant de site de réplication du HCV se forment autour de gouttelettes lipidiques cytosoliques (cGL) qui sont des organelles permettant le stockage de lipides (Lee *et al.*, 2019b). Après synthèse au niveau du RE, la protéine Core mature forme des homodimères et est acheminée aux cGL (Barba *et al.*, 1997; Miyanari *et al.*, 2007). Les cGL sont formées d'une membrane dérivée du RE contenant une seule couche de phospholipides enfermant un cœur hydrophobe composé de lipides neutres et de cholestérol. Le but de la localisation de Core aux cGL n'est pas connu, cependant l'inhibition de ce trafic par mutation de Core est fortement délétère pour l'assemblage de nouveaux virions (Boulant *et al.*, 2007; Miyanari *et al.*, 2007). L'une des hypothèses avancées est que la séquestration de Core empêche son interaction avec le génome viral pouvant interférer avec la réplication. Le trafic de Core vers les cGL nécessite des facteurs cellulaires. L'inhibition de cPLA2 (*cytosolic phospholipase A2*) empêche l'assemblage des virions. La complémentation par ajout d'acide arachidonique, le produit de cPLA2, permet d'outrepasser l'inhibition de cPLA2 et de restaurer l'assemblage viral (Menzel *et al.*, 2012). DGAT1 (*diacylglycerol O-acetyltransferase 1*) est une enzyme impliquée dans la synthèse des triglycérides stockés dans les cGL. La diminution de

l'expression de DGAT1 ou l'inhibition de son activité enzymatique induisent une diminution du trafic de Core et de la production virale (Herker *et al.*, 2010). DGAT1 est également responsable de la relocalisation de NS5A au niveau des cGL afin de permettre son interaction avec Core nécessaire à l'assemblage viral (Camus *et al.*, 2013). Enfin, l'interaction de TIP47 (*tail interacting protein of 47 kDa*) avec NS5A est nécessaire à l'infection par le HCV (Ploen *et al.*, 2013). Une hypothèse est que DGAT1 et TIP47 induisent la relocalisation de l'ARN viral porté par NS5A à la surface des cGL, permettant alors la formation d'un complexe nucléoprotéique entre Core et le génome du HCV (Camus *et al.*, 2013; Ploen *et al.*, 2013; Vogt *et al.*, 2013). Le complexe entre les oligomères de Core et le génome viral doit ensuite être acheminé au niveau des membranes du RE afin de permettre l'assemblage puis la maturation des particules virales.

ii. Assemblage et maturation des particules virales

Les oligomères de Core en complexe avec l'ARN génomique du HCV sont reconnus par la protéine virale p7 et acheminés à la membrane du RE grâce à une interaction entre p7 et NS2 (Gentsch *et al.*, 2013; Jirasko *et al.*, 2010; Popescu *et al.*, 2011). Une interaction du complexe p7-NS2 avec NS3-4A permet ensuite la localisation de la nucléoprotéine virale dans la particule virale naissante (Phan *et al.*, 2011; Pietschmann *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2017). Après leur synthèse, les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 sont incorporées dans la membrane du RE où elles forment des hétérodimères (Brazzoli *et al.*, 2005; Dubuisson *et al.*, 1994). Le domaine acide situé en C-terminal de NS4A interagit avec E1. Cette interaction est nécessaire à l'incorporation de la nucléoprotéine virale lors de l'assemblage (Figure 14). En effet, des mutations de la région C-terminale de NS4A ont mené à la sécrétion d'oligomères de Core dépourvus d'ARN viral (Roder *et al.*, 2019).

De manière générale, les virus enveloppés empruntent les voies de sécrétion cellulaires passant par le RE et l'appareil de Golgi. Ces voies permettent à la fois l'enveloppement des virions ainsi que la maturation des glycoprotéines d'enveloppe (Krijnse-Locker *et al.*, 1994; Mackenzie & Westaway, 2001; Mettenleiter, 2002; Moulard & Decroly, 2000). La particule virale du HCV forme une LVP en interagissant avec différentes VLDL telles que apoB et apoE (André *et al.*, 2002; Bartenschlager *et al.*, 2011). La synthèse des VLDL nécessite différents événements de lipidation ayant lieu dans le RE et dans l'appareil de Golgi permettant la formation de particules qui sont ensuite sécrétées (Shelness & Sellers, 2001).

Le HCV nécessitant la biosynthèse de VLDL, il a d'abord été postulé que la voie de sécrétion du HCV cooptait la voie de sécrétion des VLDL pour son export (Gastaminza *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2007; Jiang & Luo, 2009). Cependant, des études récentes ont montré que la sécrétion des particules virales du HCV implique une voie de sécrétion différente de la voie canonique utilisée pour la sécrétion des VLDL (Bayer *et al.*, 2016; Mankouri *et al.*, 2016). Les particules virales bourgeonnent dans le RE puis sont acheminées vers l'appareil de Golgi dans des vésicules COPII (Syed *et al.*, 2017). NS2 induit une modification de l'architecture du réseau trans-golgien (RTG) permettant une interaction de Core à la surface des gouttelettes lipidiques avec les membranes du RTG (Mankouri *et al.*, 2016). La sécrétion des particules virales se fait ensuite par une voie impliquant le RTG et les endosomes, selon un mécanisme différent de la sécrétion des VLDL et encore inconnu (Bayer *et al.*, 2016; Mankouri *et al.*, 2016).

4. Traitements antiviraux ciblant le HCV

a. Pathogénèse et guérison

L'infection chronique par HCV est responsable de 10 à 25 % des cas de CHC et représente le deuxième facteur de risque de développement d'un CHC (Ghouri *et al.*, 2017). Sur une durée de 20 à 30 ans, entre 20 et 30 % des patients atteints de manière chronique par le HCV développent une cirrhose et entre 1 et 4 % de ces patients développent un CHC chaque année (Chen & Morgan, 2006; Patel *et al.*, 2006). Environ 71 millions de personnes sont actuellement infectées de manière chronique par le HCV dans le monde (Blach *et al.*, 2017). De ce fait, l'infection par le HCV représente un problème de santé publique majeur et le développement de stratégies thérapeutiques permettant d'éliminer l'infection et de prévenir le développement de CHC est nécessaire (Edlin *et al.*, 2015; Scheel & Rice, 2013). Actuellement, le succès d'une thérapie contre le HCV est déterminé par la réponse virale soutenue (RVS) caractérisée par une absence de détection de l'ARN du HCV douze semaines après l'arrêt des traitements. La RVS est maintenue dans le temps et comporte un taux de rechute inférieur à 1 % (Crouch et al., 2018; Poordad & Dieterich, 2012).

b. La révolution des agents antiviraux à action directe

Jusqu'au début des années 2010, les infections par le HCV étaient traitées par une combinaison d'interféron α pégylé (PEG-IFN- α) et de ribavirine (RBV) pendant 24 ou 48 semaines. L'efficacité médiocre de ce traitement ne permettait d'atteindre une RVS que chez

50 % des patients au maximum et le traitement était accompagné d'effets indésirables forts tels une anémie, des symptômes grippaux et des troubles psychiatriques pouvant mener à la dépression du patient (Pawlotsky, 2014). En 2011, une révolution thérapeutique a démarré avec l'approbation de deux traitements oraux basés sur des agents antiviraux à action directe (DAA – *direct acting antiviral*), le Bocéprévir et le Télaprévir. Le développement d'une thérapie basée sur le Bocéprévir et le Télaprévir utilisés en combinaison avec PEG-IFN- α et RBV a permis d'améliorer le taux de RVS jusqu'à 70 %. Cependant, ces traitements étaient accompagnés de nombreux effets secondaires dus à un dosage élevé des traitements et nécessitant un régime alimentaire strict (Kiser *et al.*, 2012; Pawlotsky, 2014).

En 2013, la révolution amorcée par le Bocéprévir et le Télaprévir s'est poursuivie avec l'approbation, à quelques semaines d'écart, du Sofosbuvir et du Siméprévir. Ces deux traitements sont des DAA administrés oralement une fois par jour. Ce sont les premiers traitements à être bien tolérés et permettant d'atteindre un taux de RVS supérieur à 90 % lorsque administrés en combinaison ou avec PEG-IFN- α et RBV (Crouchet *et al.*, 2018; Sulkowski *et al.*, 2016).

Depuis, plusieurs DAA ne nécessitant plus l'utilisation thérapeutique de PEG-IFN- α ont été approuvés. Des combinaisons de traitements existent maintenant pour traiter les patients atteints des différents génotypes du HCV et à différents stades de la maladie hépatique. Les DAA ciblent directement la fonction d'une protéine virale. Les traitements dont le nom se termine par « -prévir » ciblent la protéase NS3/4A, ceux terminant par « -buvir » ciblent la polymérase NS5B et ceux terminant par « -asvir » ciblent NS5A (Kish *et al.*, 2017). En 2016, les combinaisons de DAA Sofosbuvir/Velpatasvir et Grazoprevir/Elbasvir ont été approuvées dans le traitement pour tous les génotypes du HCV et ont un taux de RVS de plus de 95 % (Asselah *et al.*, 2016; Li & De Clercq, 2017).

Les DAA, bien que très prometteurs, possèdent également des désavantages. Le premier désavantage est lié à leur coût, très élevé, limitant largement leur accessibilité notamment dans les pays en voie de développement. Aux États-Unis par exemple, le coût associé aux thérapies contre le HCV est passé de 77 millions de dollars en 2009 à 18,4 milliards de dollars en 2015 après la mise sur le marché des DAA (Suda *et al.*, 2017). Les DAA ciblant directement les protéines virales, des résistances peuvent apparaître dues aux mutations induites par la faible fidélité de la polymérase virale (Nitta *et al.*, 2019). De ce fait, de nouvelles stratégies thérapeutiques sont nécessaires. Le développement de traitements ciblant l'hôte

(HTA – *host-targeting agent*) permettrait de limiter l'apparition de résistance et pourrait également permettre de traiter les patients encore difficiles à traiter comme les patients atteints d'une cirrhose avancée ou les patients atteints d'insuffisance rénale (Crouch et al., 2018).

II. Réponses immunitaires innée et adaptative lors d'une infection par le HCV

1. La réponse immunitaire innée intracellulaire

Au début de l'infection, le HCV déclenche très rapidement différents mécanismes de défense immunitaire intracellulaire. Les cellules expriment des PRR (*Pattern recognition receptor*) dont le rôle est de reconnaître des composants viraux appelés PAMP (*Pathogen-associated molecular pattern*) (Medzhitov & Janeway, 1997). Les PRR intracellulaires reconnaissent principalement des acides nucléiques viraux dont la structure est inhabituellement retrouvée dans la cellule (ARN non-coiffé en 5', intermédiaire de réplication double-brin...) permettant la différenciation entre le soi et le non-soi (Janeway & Medzhitov, 2002; Thompson et al., 2011). La reconnaissance de PAMP permet l'activation de plusieurs voies de signalisation induisant l'expression de gènes qui interfèrent avec différentes étapes du cycle viral. Cependant, bien que l'infection aiguë par le HCV induise la mise en place d'une réponse immunitaire innée, elle n'est suffisamment efficace que chez 30 % des patients dont l'infection aiguë se termine par une clairance du virus. Chez 70 % des patients en revanche, l'induction de l'immunité innée ne permet pas le contrôle de l'infection virale et les mécanismes de contre-défense mis en place par le virus permettent une évolution vers l'infection chronique se traduisant par un équilibre entre réponse immunitaire et réplication virale (Chen & Morgan, 2006).

a. Détection du HCV

Rapidement après son entrée dans la cellule, le génome du HCV est reconnu principalement par RIG-I (*Retinoic acid-inducible gene-1*), une hélicase comportant une boîte DExD/H impliquée dans la reconnaissance de différents virus à ARN (Saito et al., 2008; Yoneyama et al., 2015). L'extrémité 5'ppp non-coiffée du génome ainsi que le domaine poly-U dans la région 3' UTR constituent des PAMP induisant l'activation de RIG-I (**Figure 15**) (Loo

Introduction – Partie I

et al., 2006; Saito et al., 2008). MDA5 (*Melanoma differentiation-associated Protein 5*) peut également reconnaître les intermédiaires de réplication sous forme d'ARN double-brin (ARNdb), induisant son activation et la production d'IFN- β et IFN- γ (Cao et al., 2015; Du et al., 2016; Hiet et al., 2015).

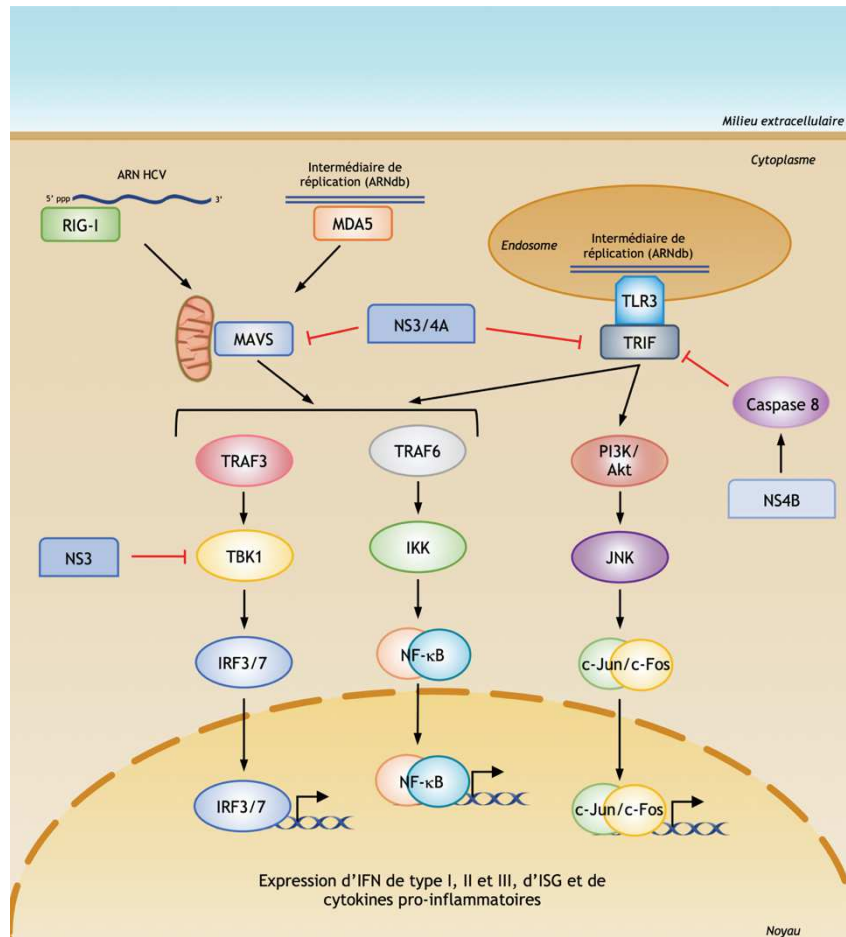


Figure 15 : Détection du HCV par les PRR (*Pathogen recognition receptor*) et inhibition par les protéines virales. L'ARN du HCV n'étant pas coiffé, son extrémité 5'ppp est reconnue par RIG-I. L'intermédiaire de réplication sous forme d'ARN double brin (ARNdb) est reconnu par MDA5. RIG-I et MDA5 activent MAVS à la surface de la membrane mitochondriale. L'activation de MAVS recrute TRAF3 et TRAF6 qui activent les voies IRF3/7 et NF- κ B, respectivement. L'intermédiaire de réplication peut également se retrouver dans un endosome où il est reconnu par TLR3. L'activation de TLR3 induit le recrutement de TRIF, qui induit à son tour l'activation des voies TRAF3 et TRAF6 ainsi que de la voie PI3K/Akt. La voie PI3K/Akt mène à l'activation du facteur de transcription AP-1 composé de c-Jun et c-Fos. Les facteurs de transcription IRF3/7, NF- κ B et AP-1 sont transloqués dans le noyau où ils activent l'expression d'interféron (IFN) de type I, II et III, d'ISG (*Interferon stimulated gene*) et de cytokines pro-inflammatoires. Les actions inhibitrices de NS3/4A et NS4B sont représentées. NS3/4A clive TRIF et le domaine cytoplasmique de MAVS empêchant la signalisation par ces facteurs. Le domaine hélicase de NS3 interagit également avec TBK1 inhibant son interaction avec IRF3. NS4B active la protéine Caspase8 qui induit la dégradation de TRIF.

La reconnaissance de l'ARN du HCV par RIG-I et MDA5 induit un changement de conformation et l'activation de MAVS *via* leur domaine CARD (*Caspase recruitment domain*)

(Jiang *et al.*, 2012b; Kowalinski *et al.*, 2011; Meylan *et al.*, 2005). Après activation, MAVS recrute TRAF2, TRAF5 et TRAF6, faisant partie des facteurs associés au récepteur du facteur de nécrose tumorale (TRAF ; TNF – *Tumor necrosis factor*), permettant l'activation d'un complexe contenant TBK1 (*TANK Binding Kinase 1*), une protéine kinase à sérine-thréonine, et d'un complexe composé des kinases IKK (*Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase*) (Liu *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2005). Le complexe de TBK1 induit la phosphorylation et l'activation du facteur de transcription IRF3 (*Interferon regulatory factor 3*) et le complexe IKK active NF- κ B (*Nuclear factor kappa B*). IRF3 et NF- κ B sont alors transloqués dans le noyau afin d'induire l'expression d'interféron, de différents ISG (*Interferon stimulated gene*) dont des cytokines (Figure 15) (Kawai *et al.*, 2005; Meylan *et al.*, 2005; Seth *et al.*, 2005). TLR3 (*Toll-like receptor 3*) est exprimé dans les hépatocytes infectés par le HCV et reconnaît également les intermédiaires de réplication sous forme d'ARNdb. La transduction de signal par TLR3 passe par l'activation de TRIF (*TLR domain containing adapter-inducing IFN- β*) induisant à son tour l'activation des facteurs de transcription IRF3 et NF- κ B et l'induction de l'état antiviral cellulaire (Li *et al.*, 2012a; Wang *et al.*, 2009). L'activation de IRF3 et NF- κ B induit l'expression d'ISG ainsi que la production et la sécrétion des interférons de type I (α , β), II (γ) et III (λ) par la cellule infectée. Les interférons reconnaissent leur récepteur à la surface cellulaire et agissent de manière autocrine et paracrine afin d'activer à leur tour l'expression d'ISG (Majoros *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017).

b. Régulation de l'expression des ISG

i. La voie canonique

Dans le milieu extracellulaire, les IFN de type I se lient à leur récepteur exprimé à la surface cellulaire sous forme d'hétérodimère d'IFNAR (IFN- α *receptor*)-1 et IFNAR-2. Le récepteur à l'IFN de type III (IFNLR) est formé par un hétérodimère de IFN λ R1 (*IFN- λ receptor 1*) et de IL10R β (Figure 16). Contrairement au récepteur à l'IFN de type I qui est ubiquitaire, l'expression de l'IFN de type III ainsi que de son récepteur semble avoir une certaine spécificité cellulaire permettant une réponse plus sélective (Galani *et al.*, 2015; Sommereyns *et al.*, 2008). En revanche, la voie de signalisation canonique induite est identique pour les deux types. JAK1 (*Janus kinase 1*) et TYK2 (*Tyrosine kinase 2*) interagissent avec IFNAR et IFNLR. La liaison des IFN de type I et III à leur récepteur induit la *trans*-phosphorylation de JAK1 et de

Introduction – Partie I

TYK2 puis la phosphorylation du domaine cytoplasmique des récepteurs par JAK1 (pour une revue voir (Stark & Darnell, 2012)). *Signal transducers & activators of transcription* (STAT)-1 et -2 sont alors recrutés et phosphorylés sur différentes sérines et tyrosines. Ceci induit la formation d'un hétérodimère STAT1-STAT2 qui interagit avec IRF9 (*Interferon regulatory factor 9*) afin de former le complexe ISGF3 (*IFN-stimulated gene factor 3*) (Qureshi *et al.*, 1995). IRF9 ne possède pas de fonction d'activation de la transcription, cependant il reconnaît et se lie à l'ADN sur des éléments de promoteur spécifiques appelés ISRE (*IFN-stimulated response element*). IRF9 permet donc d'orienter le complexe ISGF3 sur des régions spécifiques de l'ADN contenant les éléments ISRE afin que STAT1 et STAT2 activent la transcription d'ISG.

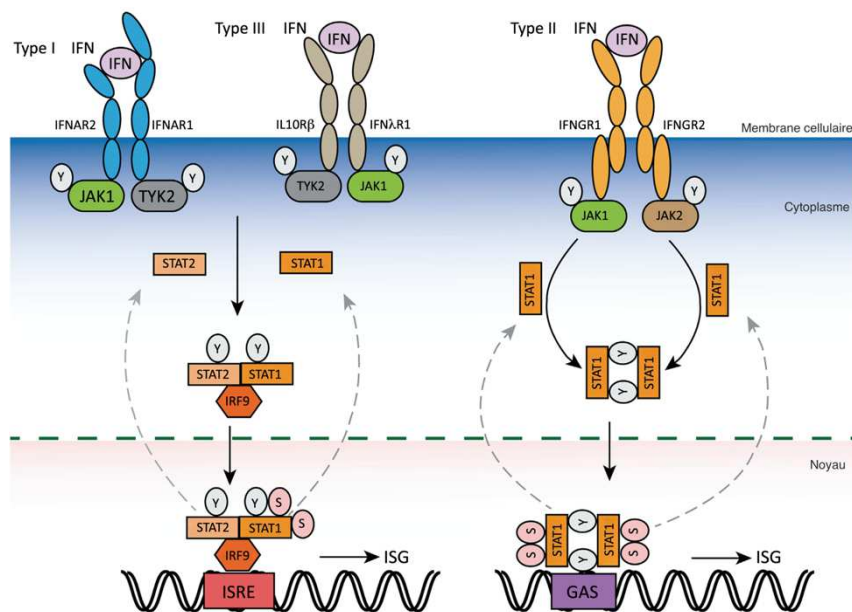


Figure 16 : La voie canonique de régulation de l'expression des ISG (*Interferon stimulated gene*). La stimulation des différentes voies interféron (IFN) fait intervenir l'interaction entre les trois types d'IFN et leur récepteur spécifique, chacun formé d'un hétérodimère. Les IFN de type I et III activent les kinases JAK1 et TYK2 qui phosphorylent des résidus tyrosine des récepteurs. STAT1 et STAT2 sont ensuite recrutés et phosphorylés, puis recrutent IRF9 afin de former le complexe ISGF3 (*IFN-stimulated gene factor 3*). L'IFN de type II active les kinases JAK1 et JAK2 qui phosphorylent des résidus tyrosine du récepteur. Un homodimère de STAT1 est recruté puis phosphorylé. ISGF3 et l'homodimère de STAT1 sont transloqués dans le noyau où ils interagissent avec des séquences cibles de l'ADN ISRE (*IFN-stimulated response element*) et GAS (*γ-activated sequence*), respectivement, permettant l'expression d'ISG (adapté de Wang *et al.*, 2017).

Le récepteur à l'IFN de type II (IFNGR) est également formé par un hétérodimère, composé des sous-unités IFNGR1 et IFNGR2 (Blouin & Lamaze, 2013), associé du côté cytoplasmique à JAK1 et JAK2 (Figure 16). De manière similaire aux IFN de type I et III, l'interaction de l'IFN- γ avec son récepteur induit la *trans*-phosphorylation de JAK1 et JAK2.

Ceci induit le recrutement et la phosphorylation de STAT1, formant alors un homodimère de STAT1 phosphorylés qui est ensuite transloqué dans le noyau. Là, il reconnaît la séquence GAS (*γ-activated sequence*), présente dans le promoteur de gènes exprimés en réponse à l'IFN- γ , afin d'activer la transcription (Vilcek, 2003). Bien que théoriquement IRF9 ne devrait être impliqué que dans la régulation de l'expression d'ISG stimulée par les IFN α et λ , il a été observé qu'en l'absence d'IRF9, l'expression d'ISG lors d'une stimulation par l'IFN- γ est fortement impactée et que la stimulation à l'IFN- γ induit une augmentation de l'expression d'IRF9 (John *et al.*, 1991; Kimura *et al.*, 1996). De ce fait, une stimulation par les IFN de type I et II peut avoir un effet synergique sur l'expression d'IRF9 et la formation du complexe ISGF3 (Levy *et al.*, 1990).

ii. Régulations de la voie canonique

Les voies de signalisation induites nécessitent d'être régulées au niveau des différents phénomènes de phosphorylation, notamment des protéines JAK et STAT. JAK1, JAK2 et TYK2 font partie de la famille des protéines JAK composée en tout de quatre membres dont le quatrième est JAK3 (Babon *et al.*, 2014). Afin d'empêcher une activation constante de l'immunité innée qui serait délétère pour la cellule, l'activation des JAK induit également un rétro-contrôle négatif. Plusieurs phosphatases sont impliquées, dont TCPTP (*T-cell protein tyrosine phosphatase*), PTP1B (*Protein tyrosine phosphatase 1B*) et CD45, afin de permettre la déphosphorylation des JAK et leur retour à un état inactif (Irie-Sasaki *et al.*, 2001; Myers *et al.*, 2001; Simoncic *et al.*, 2002). JAK2 peut également être ubiquitinylée par SOCS1 (*Suppressor of cytokine signalling 1*) afin d'induire sa dégradation par le protéasome (Ali *et al.*, 2003; Kamizono *et al.*, 2001). Récemment, il a également été montré que SOCS1 induit une inhibition directe des activités kinases de JAK1 et JAK2 indépendamment de leur ubiquitinylation (Liau *et al.*, 2018).

STAT1 est phosphorylée par les JAK dans le cas des voies IFN, mais elle peut également être phosphorylée par d'autres voies de signalisation. Lors d'un stress, il a été montré que la voie p38-MAPK (*Mitogen activated protein kinase*) peut induire la phosphorylation de STAT1 sur la sérine 727 menant à l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 β , IL-8 ou IP-10 (Ramsauer *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2013). La voie *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K)-Akt permet également la phosphorylation de STAT1 sur ce même résidu par l'activation des protéines PKC (*Protein kinase C*)- δ et PKC- ϵ (Choudhury, 2004; Deb *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*,

2001; Uddin *et al.*, 2002). De ce fait, la phosphorylation de STAT1 doit également être hautement régulée afin d'éviter une surexpression d'ISG. La protéine SHPTP1 (*SH2 domain-containing tyrosine phosphatase 1*) interagit avec IFNAR. Lors d'une stimulation à l'IFN- α , elle se détache du récepteur de manière transitoire, puis est à nouveau recrutée afin de déphosphoryler les résidus tyrosine de JAK1 et STAT1 (David *et al.*, 1995). Le rôle de cette phosphatase est de limiter la durée de l'activation de STAT1 par JAK1 lors d'une stimulation à l'IFN, cependant elle ne semble pas impliquée dans la limitation de la phosphorylation de STAT1 à l'état basal. La déphosphorylation de STAT1 a également lieu dans le noyau, une fois l'activation de l'expression d'ISG établie, afin d'empêcher une expression prolongée de ces gènes. Deux phosphatases ont été identifiées dans la déphosphorylation nucléaire de STAT1 : PTPN11 (*Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11*) et TC45, la forme nucléaire de TCPTP, dont la forme cytoplasmique est impliquée dans la déphosphorylation des JAK (Hoeve *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2002). Les ISG sont impliquées dans la réponse immunitaire innée mais également dans la survie cellulaire ou dans l'apoptose. De ce fait, plusieurs phosphatases sont dérégulées dans les cellules cancéreuses induisant une régulation aberrante des différentes protéines STAT (He *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2018). De plus, il a été observé que PIAS (*Protein inhibitor of activated STAT*) modifie STAT1 par sumoylation sur la lysine 703, et que la mutation de ce résidu induit une augmentation de l'activité transcriptionnelle de STAT1 (Ungureanu *et al.*, 2005). La sumoylation de STAT1 permet à la fois de diminuer la phosphorylation de la tyrosine 701 et augmente sa solubilité afin de faciliter la déphosphorylation des autres résidus après stimulation à l'IFN- γ (Begitt *et al.*, 2011).

Pour induire la transcription des ISG, la chromatine doit être relâchée afin de permettre l'accès des facteurs de transcription aux promoteurs. De manière générale, les histones régulent la compaction de la chromatine en formant des octamères qui se lient à l'ADN pour former des nucléosomes induisant la compaction de l'ADN qui empêche l'accès des facteurs de transcription aux promoteurs (Bell *et al.*, 2011). La modulation de l'état de compaction de la chromatine est possible par l'acétylation des histones qui induit généralement un relâchement de la chromatine. Cette modification post-traductionnelle est régulée par des enzymes pouvant acétyler (HAT – *Histone acetyltransferase*) ou désacétyler (HDAC – *Histone deacetylase*) les histones. L'activation de la transcription des ISG nécessite l'activité de protéines de la famille des HAT, dont p300/CBP et GCN5 (Bhattacharya *et al.*, 1996; Paulson *et al.*, 2002). De manière intéressante, il a également été reporté que l'activité

de plusieurs HDAC est nécessaire à l'induction de la transcription des ISG induite par une stimulation à l'IFN de type I et II, mais elle est également nécessaire à la phosphorylation de STAT1 et de JAK1 (Chang *et al.*, 2004; Klampfer *et al.*, 2004; Nusinzon & Horvath, 2003; Shakespear *et al.*, 2011). Une étude a également montré que l'utilisation de trichostatine A, un inhibiteur de HDAC, empêche le recrutement de l'ARN polymérase II (ARNpol II) au niveau de promoteur d'ISG lors d'une stimulation à l'IFN- β et qu'IRF9 nécessite l'activité HDAC pour permettre le recrutement de l'ARNpol II (Sakamoto *et al.*, 2004). HDAC3 forme un complexe avec NCOR2 (*Nuclear corepressor 2*) et FOXO3 (*Forkhead box O3*) limitant la transcription des ISG en gardant la chromatine dans un état compact. La stimulation à l'IFN de type I active la voie PI3K/Akt ce qui permet l'inhibition de l'expression de FOXO3 et l'ouverture de la chromatine nécessaire à la transcription (Litvak *et al.*, 2012).

iii. Les voies non-canoniques de l'expression des ISG

La voie canonique de signalisation JAK/STAT, impliquant STAT1 et STAT2 pour l'IFN de type I et uniquement STAT1 pour l'IFN de type II, est bien décrite depuis la fin des années 90 (Stark & Darnell, 2012). Cependant, de plus en plus d'études montrent que les voies de signalisation impliquées dans la stimulation aux IFN sont bien plus nombreuses et variées, certaines impliquant STAT1 et STAT2, d'autres non. De plus, des activations croisées ont été observées entre différentes voies de l'immunité innée et de l'inflammation, accentuant la complexité des interactions menant à l'expression des ISG ainsi que leur régulation (**Figure 17**).

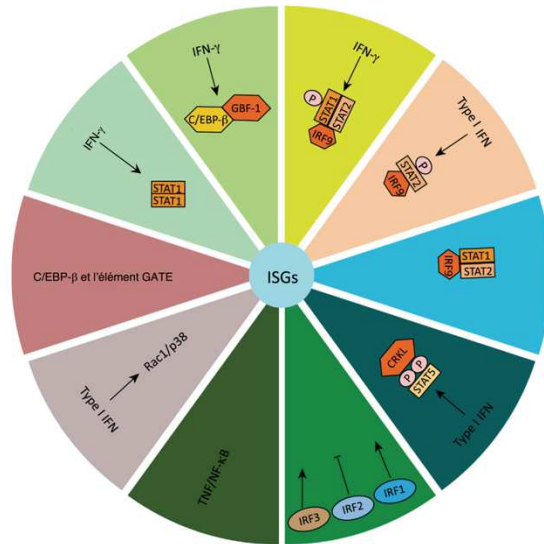


Figure 17 : Mécanismes canoniques et non-canoniques de la régulation de l'expression d'ISG. ISGF3, l'homodimère de STAT1 ainsi que les mécanismes non-canoniques de la régulation de la transcription des ISG sont représentés. Ces différents mécanismes participent de manière coordonnée à la défense cellulaire contre les pathogènes (adapté de Wang *et al.*, 2017).

iii.1. Les différents complexes ISGF3

Le complexe ISGF3 canonique est formé après stimulation par l'IFN de type I et est composé des formes phosphorylées de STAT1 et STAT2 (P-STAT1 ; P-STAT2) et de la protéine IRF9. Il a été décrit que la stimulation à l'IFN- γ permet la formation d'un complexe appelé ISGF3^{II}. Ce complexe, composé de P-STAT1, de STAT2 non-phosphorylée et d'IRF9, a été observé 24 heures post-traitement à l'IFN- γ et se met en place dans un second temps (Morrow *et al.*, 2011). ISGF3^{II} stimule l'expression de gènes contenant une séquence ISRE dans leur promoteur, cependant le niveau d'expression observé de ces gènes est plus faible que lors d'un traitement à l'IFN- α . De nombreuses études ont également montré la formation de différents complexes entre STAT2 et IRF9, de manière indépendante de STAT1 (pour une revue voir (Fink & Grandvaux, 2013)). Ces complexes variés peuvent contenir STAT2 sous forme mono- ou dimérique, phosphorylée ou non et activent la transcription de gènes ayant des séquences ISRE ou GAS dans leur promoteur. Il a par exemple été observé, dans une lignée cellulaire dérivée de carcinome hépatocellulaire, que la stimulation à l'IFN- α induit la phosphorylation de STAT1 et de STAT2, mais que l'expression de MX1 et de PKR (*Protein kinase R*) est dépendante de STAT2 et d'IRF9 uniquement et que STAT1 n'est pas impliquée (Sarkis *et al.*, 2006). L'exposition continue aux IFN, même en faible quantité, peut également

induire la formation d'un complexe U-ISGF3 contenant les formes non-phosphorylées de STAT1 et de STAT2 (Cheon *et al.*, 2013). Ce complexe a été observé dans le cas d'infection par le HCV, menant à l'activation constante de l'expression d'ISG (Sung *et al.*, 2015).

iii.2. [Les IRF](#)

IRF9 est le facteur canonique permettant la reconnaissance des séquences ISRE dans les promoteurs d'ISG. Les promoteurs d'un certain nombre d'ISG contiennent également une séquence appelée IRF-E, chevauchante avec la séquence ISRE. Cette séquence est reconnue par le facteur de transcription IRF1 afin d'activer la transcription de ces ISG. IRF2 joue le rôle de répresseur en reconnaissant la même séquence et en empêchant l'activation de la transcription induite par IRF1 (Harada *et al.*, 1994; Ivashkiv & Donlin, 2014). IRF1 intervient également dans la régulation de la voie JAK-STAT en augmentant l'expression et la phosphorylation de STAT1 (Xu *et al.*, 2016).

Durant une infection virale, IRF3 est activé et forme un complexe appelé *enhanceosome* avec NF- κ B et ATF2/c-Jun. Ce complexe est recruté au niveau du promoteur d'IFN- β et induit son expression (Kim & Maniatis, 1997; Merika *et al.*, 1998; Wathélet *et al.*, 1998). L'IFN- β produit pourra alors agir de manière autocrine et paracrine pour activer la voie JAK-STAT. IRF3 a également été décrit comme directement impliqué dans l'expression d'ISG et la mise en place de l'immunité antivirale, notamment lors de l'entrée du HSV-1 (*Herpes simplex virus 1*) (Collins *et al.*, 2004; Grandvaux *et al.*, 2002).

iii.3. [IFN et TNF- \$\alpha\$](#)

Le TNF- α est une cytokine impliquée dans l'induction de l'état inflammatoire *via* l'activation du facteur de transcription NF- κ B. Il a également été observé depuis de nombreuses années que le traitement de cellules avec une combinaison de TNF- α et d'IFN- β ou γ favorise l'induction d'un état antiviral cellulaire de manière synergique (Bartee *et al.*, 2009; Mestan *et al.*, 1988). L'effet synergique est dépendant du traitement direct avec ces deux cytokines et ne fait pas intervenir de facteur intermédiaire. De plus, TNF- α induit une voie de signalisation différente et indépendante de la voie JAK/STAT. Le pouvoir antiviral du TNF- α lui permet d'inhiber l'infection par plusieurs virus dont le HCV, le virus de la grippe ou encore le virus ectromelia, un pathogène murin (Ruby *et al.*, 1997; Seo & Webster, 2002;

Wang *et al.*, 2016). L'infection par le HCV induit l'activation du facteur de transcription NF- κ B et la production de TNF- α par la voie TLR7/8 (Lee *et al.*, 2015). Le TNF- α agit de manière autocrine et paracrine pour activer la voie NF- κ B et maintenir un état antiviral en activant l'expression d'un groupe de gènes dont le promoteur contient un motif ISRE (Wang *et al.*, 2016). De plus, l'activation de la voie NF- κ B induit la production d'IFN. La synergie du TNF- α et de l'IFN est également augmentée par la restauration de l'expression d'IFNAR2 dont la diminution est induite par le HCV (Lee *et al.*, 2015). De ce fait, le traitement de cellules infectées par le HCV avec du TNF- α et de l'IFN- α induit un effet synergique sur l'augmentation de l'expression d'ISG ainsi que de l'inhibition de l'infection par le HCV (Wang *et al.*, 2016).

iii.4. C/EBP- β et l'élément GATE

L'expression de certains gènes, lors d'une stimulation à l'IFN- γ , ne dépend pas de la présence d'une séquence GAS dans leur promoteur, mais d'une autre séquence appelée GATE (*γ -IFN-activated transcriptional element*) (Hu *et al.*, 2002). Le traitement à l'IFN- γ induit une cascade de signalisation impliquant les kinases MEKK1 (*MAP/ERK kinase kinase 1*) et MEK (*MAPK/ERK kinase*) 1/2, faisant partie de la famille des MAPK, ainsi que ERK (*Extracellular regulated-signal kinase*) 1/2 (Hu *et al.*, 2001; Roy *et al.*, 2002). Il semblerait que l'activation d'ERK1/2 soit dépendante de STAT1, cependant certains résultats sont contradictoires. La dépendance de STAT1 pourrait n'intervenir que dans un second temps (Gough *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2001). Le facteur de transcription C/EBP- β (*CCAAT/enhancer-binding protein- β*) est phosphorylé par ERK1 et ERK2 dans le noyau induisant son activation et le recrutement de GBF1 (*GATE-binding factor 1*) (Hu *et al.*, 2001; Meng *et al.*, 2005). GBF1 est un transactivateur de la transcription à partir de l'élément GATE, cependant sa capacité de liaison à l'ADN est très faible. La formation du complexe GBF1-C/EBP- β est recruté de manière forte et spécifique au niveau de promoteurs contenant l'élément GATE et active l'expression de ces gènes (Weihua *et al.*, 2000). De manière intéressante, C/EBP- β est également impliqué dans plusieurs étapes de la pathogenèse du HIV (virus de l'immunodéficience humaine) dont l'activation de sa transcription (Henderson *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2009b).

iii.5. La voie de signalisation Rac1/p38

La stimulation à l'IFN de type I induit l'activation de Rac1, une petite GTPase, puis de MKK3 (*Map kinase kinase 3*) et MKK6 (*Map kinase kinase 6*) (Li *et al.*, 2005c; Uddin *et al.*, 2000). MKK3 et MKK6 phosphorylent et activent p38 de la famille des MAP kinase induisant l'expression d'ISG dont ISG15 et IRF9. L'activation de p38 et de l'expression des ISG est indépendante de la phosphorylation de STAT1 et de la formation du complexe ISGF3, montrant que les deux mécanismes sont complémentaires (Li *et al.*, 2004; Uddin *et al.*, 1999). L'activation de p38, lors d'une stimulation à l'IFN- α , induit la phosphorylation de MSK1. MSK1 est une kinase dont l'activation est régulée par les voies de signalisation p38 et ERK (Thomson *et al.*, 1999a). Son activité kinase est impliquée dans la régulation de la phosphorylation de l'histone H3 et de HMG-14 (*High-mobility group (nonhistone chromosomal) protein 14*) permettant l'induction rapide de l'expression de gènes en réponse à des stress (Thomson *et al.*, 1999b, 2001). Le rôle de p38 dans l'induction de l'expression des ISG est un mécanisme complexe qui pourrait faire intervenir le remodelage de la chromatine par l'activation de MSK1. Cependant, p38 régule également l'activité de nombreux facteurs de transcription pouvant être impliqués dans l'expression d'ISG. Leur rôle précis n'a cependant pas été étudié.

c. Mécanismes de contre-défense du HCV

Les défenses antivirales se mettent en place et sont activées très rapidement après l'entrée du virus dans la cellule hôte (Loo *et al.*, 2006; Yoneyama *et al.*, 2015). Lors de la phase aiguë de l'infection, le HCV est éliminé spontanément par le système immunitaire de l'hôte chez 30 % des patients. La mise en place rapide de l'immunité innée est nécessaire au contrôle efficace de l'infection virale et à l'élimination du HCV (Chen & Morgan, 2006; Zhu *et al.*, 2007). Cependant, chez 70 % des patients infectés, le virus n'est pas éliminé par le système immunitaire et l'infection devient chronique et persistante. Le HCV peut contrecarrer les mécanismes de défenses antivirales permettant la mise en place de l'infection chronique (Chen & Morgan, 2006). Bien que le HCV exprime un petit nombre de protéines virales ayant déjà des rôles multiples dans le cycle viral, plusieurs d'entre-elles possèdent également des fonctions permettant l'inhibition de l'immunité antivirale ainsi que l'échappement du virus au système immunitaire.

i. Core

Les rôles de Core dans l'inhibition de l'immunité sont encore largement débattus, plusieurs études montrant des résultats contradictoires. La divergence de ces résultats peut s'expliquer par les différents modèles et conditions expérimentales utilisés, ainsi que par l'utilisation de systèmes d'expression transitoires.

Une étude a montré que l'activation de la voie NF- κ B en présence de différents inducteurs est inhibée lorsque Core est surexprimée (Shrivastava *et al.*, 1998). Des cellules HepG2 exprimant Core ont été utilisées afin d'étudier le transcriptome lors de l'étape précoce de l'expression de Core. L'étude du transcriptome a permis d'identifier plusieurs gènes impliqués dans l'activation de la voie NF- κ B dont l'expression est diminuée, ce qui peut mener à une baisse de l'activation de cette voie (Nguyen *et al.*, 2006). Le traitement de cellules au TNF- α induit l'expression de gènes pro-inflammatoires par activation de NF- κ B et favorise la survie cellulaire *via* l'expression de gènes anti-apoptotiques. Une étude a observé que l'expression de Core par l'infection de cellules par le HCV induit une inhibition de la translocation nucléaire de NF- κ B et une augmentation de la mort cellulaire après traitement au TNF- α (Park *et al.*, 2012)

En revanche, il a été observé que l'expression de Core seule permet l'activation de la voie NF- κ B ainsi que l'expression de gènes rapporteurs dont l'expression est sous la dépendance d'un promoteur nécessitant l'activation de NF- κ B (Kato *et al.*, 2000; Yoshida *et al.*, 2001). L'expression de Core induit une augmentation de la dégradation d'I κ B- β (*Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit beta*), un inhibiteur de la voie NF- κ B, ainsi qu'une localisation nucléaire prolongée de p50 et p65, deux facteurs de transcription de la voie NF- κ B (You *et al.*, 1999). Plus récemment, il a également été mis en évidence que l'expression de Core induit l'expression de TGF- α (*Transforming growth factor alpha*) par activation de NF- κ B (Sato *et al.*, 2006). Ceci induit la prolifération de cellules dérivées d'hépatocarcinome humain par activation de la voie MAPK/ERK.

Core est également impliquée dans la régulation de la voie JAK/STAT, cependant, comme précédemment, certains résultats divergent. Core interagit avec le domaine SH2 de STAT1 afin d'empêcher sa phosphorylation ainsi que la formation d'homodimères ou d'hétérodimères avec STAT2 (Lin *et al.*, 2006; Stone *et al.*, 2014). Core semble également capable d'induire la dégradation de STAT1 par le protéasome mais uniquement lorsqu'elle est

co-exprimée avec les protéines non-structurales E1 et E2 (Lin *et al.*, 2005). De plus, l'expression de Core induit une diminution de l'expression du récepteur IFNAR1 (He *et al.*, 2018). Bien que Core ait un effet sur l'activation de STAT1, l'effet de l'expression de Core sur les différentes voies de l'IFN semble différent, avec une inhibition de la voie de l'IFN de type I et une activation de la voie de l'IFN de type II (Hosui *et al.*, 2003; de Lucas *et al.*, 2005; Luquin *et al.*, 2007).

ii. NS3/4A

La protéase virale NS3/4A joue un rôle essentiel dans la réplication virale, mais elle permet également de limiter la réponse immunitaire innée et l'inflammation en impactant différentes voies de signalisation.

La reconnaissance du HCV par RIG-I induit l'activation de MAVS puis d'IRF3 et de NF- κ B afin de permettre la réponse antivirale (**Figure 15**). Le premier rôle décrit de NS3/4A est le clivage de la partie cytoplasmique de MAVS au niveau des membranes mitochondriales, inhibant l'expression d'IFN et d'ISG (Bender *et al.*, 2015; Horner *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2005b; Meylan *et al.*, 2005). Le clivage de MAVS a également été mis en évidence chez des patients infectés par le HCV ayant une plus faible expression d'ISG (Bellecave *et al.*, 2010; Loo *et al.*, 2006). Dans la voie de signalisation de MAVS, IRF3 et NF- κ B sont activés par les complexes TBK1 et IKK (Liu *et al.*, 2013). Le domaine hélicase de NS3 interagit avec TBK1 afin d'inhiber son interaction avec IRF3 et la translocation d'IRF3 dans le noyau (Otsuka *et al.*, 2005). De ce fait, NS3/4A agit à différents niveaux afin d'assurer l'inhibition de l'expression d'IFN et d'ISG induite par cette voie de signalisation.

L'intermédiaire de réplication du HCV sous forme d'ARNdb est reconnu par TLR3 (Wang *et al.*, 2009). TRIF, une protéine adaptatrice de TLR3, est alors activée et active à son tour les facteurs de transcription NF- κ B et IRF3 (**Figure 15**). Lors d'une infection par le HCV, TRIF est clivée par NS3/4A ce qui diminue son abondance cellulaire et inhibe l'activation de NF- κ B et IRF3 (Li *et al.*, 2005a). En inhibant l'activation des voies de signalisation induites par la détection de son génome ou de l'intermédiaire de réplication, le HCV empêche la mise en place de l'immunité antivirale dans les premières étapes de son cycle et permet la progression vers une infection chronique.

Riplet est une *E3-ubiquitin ligase* impliquée dans l'activation de RIG-I par poly-ubiquitinylation. Une première étude a montré que l'expression de NS3/4A induit une diminution de Riplet par clivage protéolytique et postulait que le clivage de Riplet induisait une diminution de l'activation de RIG-I (Oshiumi *et al.*, 2013). Cependant, une étude plus récente a montré qu'un acide aminé présent dans le domaine transmembranaire de NS4A est impliqué dans le clivage de Riplet, mais pas de MAVS, et que la voie de signalisation ciblée est non-canonique et est dépendante de Riplet, TBK1 et IRF3, mais indépendante de RIG-I et de MAVS (Vazquez *et al.*, 2019).

Lors d'un traitement au TNF- α , l'activation de NF- κ B nécessite la poly-ubiquitinylation de NEMO (*NF- κ B essential modulator*) par LUBAC (*Linear ubiquitin chain assembly complex*) (Niu *et al.*, 2011). NS3 interagit avec LUBAC et inhibe la poly-ubiquitinylation de NEMO et l'expression de cytokines inflammatoires par NF- κ B (Chen *et al.*, 2015).

iii. NS4B

Bien qu'intégralement transmembranaire, NS4B est également impliquée dans l'inhibition de la réponse immunitaire innée. L'expression de NS4B active la Caspase 8 qui induit la dégradation de TRIF (Liang *et al.*, 2018). TRIF étant impliquée dans la voie TLR3, sa dégradation par NS4B induit une inhibition de l'activation de cette voie et de la production d'IFN et d'ISG (**Figure 15**).

STING (*Stimulator of IFN genes*) est une protéine localisée à la membrane du RE et impliquée dans l'induction de la production d'IFN de type I lors d'une infection par un virus à ADN (Ishikawa & Barber, 2008; Zhong *et al.*, 2008). Une étude a montré que l'activation de la voie de signalisation de STING *in vitro* induit une baisse de la réplication virale (Yi *et al.*, 2016). Cependant, l'activation de cette voie de signalisation par l'infection par le HCV n'a encore jamais été montrée. NS4B peut interagir avec STING afin d'empêcher son interaction avec TBK1 et l'induction d'une réponse antivirale dépendante de RIG-I (Ding *et al.*, 2013; Nitta *et al.*, 2013). Le HCV n'est pas le seul virus à ARN à inhiber la voie de signalisation de STING et il est possible qu'il y ait des croisements entre les voies STING et RIG-I (Aguirre *et al.*, 2012; Ding *et al.*, 2013; Holm *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2012a). Cependant, l'importance de la voie STING dans l'immunité innée lors d'une infection par le HCV *in vivo* reste à démontrer.

iv. NS5A

PKR est une kinase impliquée dans la réponse immunitaire innée. Lorsqu'elle reconnaît un ARNdb, PKR s'auto-phosphoryle puis phosphoryle le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α , induisant une inhibition de la traduction cellulaire (Pindel & Sadler, 2010). Elle est également impliquée dans la production d'IFN- β et l'expression d'ISG (McAllister & Samuel, 2009). Le rôle de PKR dans l'infection par le HCV ainsi que la régulation de son activation sont complexes. NS5A est décrit depuis longtemps comme interagissant avec PKR et inhibant son activation (Gale *et al.*, 1997; Noguchi *et al.*, 2001). L'inhibition de l'activation de PKR par NS5A a été très étudiée notamment pour prédire l'efficacité du traitement à l'IFN- α car l'interaction NS5A-PKR explique en partie la résistance au traitement à l'IFN- α observée chez les patients (Gale *et al.*, 1998; Muñoz de Rueda *et al.*, 2008). Cependant, NS5A semble également jouer un rôle dans l'activation de PKR. L'IRES du cycle viral, et particulièrement le domaine II, est capable d'induire l'activation de PKR (Toroney *et al.*, 2010). En début de cycle, NS5A interagit avec les domaines III-IV de l'IRES, et PKR reconnaît le domaine II et est activée (Dabo & Meurs, 2012; Toroney *et al.*, 2010). L'activation de PKR au début du cycle viral permet l'inhibition de la production d'ISG, notamment par inhibition de leur traduction due à la phosphorylation d'eIF2 α (Arnaud *et al.*, 2010; Garaigorta & Chisari, 2009). La traduction du HCV n'est pas impactée par la phosphorylation d'eIF2 α ce qui permet la production de protéines virales même lors de l'activation de PKR (Arnaud *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011). L'activation de PKR a lieu en début de cycle car il est nécessaire pour le HCV d'inhiber la production d'IFN et d'ISG, or les principales actions antivirales réalisées par les protéines du HCV, dont le clivage de MAVS, n'ont lieu que plus tardivement dans le cycle viral (Arnaud *et al.*, 2010). NS5A joue un rôle de régulateur de l'activation de PKR dans différentes étapes du cycle, en permettant son activation en début de cycle viral puis en inhibant ensuite sa phosphorylation dans les étapes plus tardives.

2. Les réponses immunitaires innée et adaptative intra-hépatiques

a. La réponse des cellules *Natural killer*

La réponse immunitaire innée cellulaire contre le HCV implique principalement les cellules *Natural killer* (NK) qui représentent entre 30 et 50 % des lymphocytes hépatiques (Corado *et al.*, 1997). Elles résident dans un stade hyporéactif mais induisent une réponse

immunitaire innée rapide lors d'une infection par un pathogène (Caligiuri, 2008; Krueger *et al.*, 2011). Durant la phase aiguë de l'infection, le HCV induit une activation des cellules NK. Le HCV active la signalisation par la voie TLR3 ce qui résulte en la production d'IL-12 par les cellules dendritiques (CD) myéloïdes (CDm), induisant alors la sécrétion d'IFN- β , IFN- γ et de TNF- α par les cellules NK (Lunemann *et al.*, 2015; Siegal *et al.*, 1999; Velazquez *et al.*, 2012). Les CD plasmacytoïdes (CDp) détectent l'ARN du HCV présent dans les exosomes sécrétés par les hépatocytes infectés et sécrètent de l'IFN- α afin d'activer les cellules NK (Dreux *et al.*, 2012). La sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α inhibe la réplication du HCV et induit un état d'inflammation hépatique. Différents types de cellules NK sont retrouvés et catégorisés selon l'expression de CD16 (+ ou -) et CD56 (*dim* et *bright* lors d'une détection faible ou forte, respectivement). La cytotoxicité des cellules NK dépend de l'expression de ces récepteurs, les cellules NK CD16⁺CD56^{dim} étant plutôt cytolytiques tandis que les cellules NK CD16⁻CD56^{bright} sont généralement non-cytolytiques (Kaplan, 2015). L'action cytolytique est réalisée par la sécrétion de perforine/granzyme induisant la mort des cellules infectées. Cependant, elle induit également la mort de cellules environnantes non-infectées. Les cellules NK jouent un rôle dans la diminution de la charge virale lors de la phase aiguë de l'infection en induisant la mort des cellules infectées, en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires et en activant les lymphocytes T (Brown *et al.*, 2001; Golden-Mason & Rosen, 2006; Guidotti & Chisari, 2001). Cependant, différentes protéines du HCV modulent l'activation des cellules NK et la sécrétion de cytokines.

b. La modulation de l'activation des cellules NK par le HCV

Les cellules NK expriment le récepteur CD81 qui est un récepteur du HCV reconnu par la glycoprotéine virale E2. La liaison de E2 à CD81 à la surface des cellules NK diminue leur sécrétion d'IFN- γ et de granules cytotoxiques (Crotta *et al.*, 2002; Tseng & Klimpel, 2002). En réponse à l'IFN- α , les CD expriment MICA/B (*MHC class I-related chain A & B*) qui interagit avec NKG2D à la surface des cellules NK et induit leur activation. Une étude a observé que le contact de cellules NK avec des hépatocytes infectés par le HCV induit une diminution de la sécrétion d'IFN- γ et de l'expression de NKG2D par les cellules NK (Yoon *et al.*, 2011). De plus, l'analyse de cellules provenant de patients infectés de manière chronique par le HCV a

également montré une diminution de l'expression de MICA/B par les CD et de NKG2D par les cellules NK (Jinushi *et al.*, 2003; Wen *et al.*, 2008a).

Les hépatocytes peuvent également activer les cellules NK par expression de MICA/B. L'expression de Core et de NS5A dans une lignée de cellules Huh7.5 dérivées d'hépatocarcinome humain induit l'expression de MICA/B et son interaction avec NKG2D à la surface des cellules NK permet leur activation et l'expression des protéines du complément C3 et C4 (Kim *et al.*, 2014). Cependant, lors d'une infection virale, les protéines NS2 et NS5B induisent une diminution de l'expression de MICA/B, empêchant l'expression des protéines du complément. De plus, la stimulation de monocytes avec une protéine NS5A recombinante ou un surnageant de cellules répliquant le HCV induit l'activation de TLR4 et la production d'IL-10 qui à son tour active la production de TGF- β . La sécrétion de TGF- β diminue l'expression de NKG2D à la surface des cellules NK et leur activation (Sène *et al.*, 2010). Les différents mécanismes par lesquels le HCV affaiblit l'activation des cellules NK sont déterminants pour l'évolution de l'infection vers la chronicité.

c. La réponse inflammatoire

La réponse inflammatoire hépatique mise en place lors d'une infection par le HCV est complexe et l'inflammation chronique est fortement responsable de la progression de la maladie hépatique. Trois éléments cruciaux ont été mis en évidence dans l'induction de l'inflammation hépatique à savoir : les interactions entre le HCV et l'hôte, l'activation de l'inflammasome et la participation du microenvironnement hépatique.

i. Les interactions HCV-hôte dans l'inflammation hépatique

Tout comme la réponse immunitaire antivirale, la réponse inflammatoire dépend de la reconnaissance et de l'interaction entre des PRR et des PAMP tels que l'ARN ou des protéines du HCV. La détection de l'intermédiaire de réplication du HCV sous forme d'ARNdb est reconnu par TLR3 ce qui active sa voie de signalisation et la mise en place de la réponse antivirale (Li *et al.*, 2012a; Wang *et al.*, 2009). L'activation de NF- κ B et d'IRF3 permet également l'expression et la sécrétion de chimiokines pro-inflammatoires telles que les interleukines IL-6 et IL-8, IP-10 (*10 KDa Interferon Gamma-Induced Protein*) et MIP (*Macrophage inflammatory protein*)-1 α et -1 β (**Figure 15**) (Li *et al.*, 2012a; Wagoner *et al.*, 2007). Le HCV peut également entrer dans les macrophages par phagocytose, de manière

Introduction – Partie I

indépendante à l'expression des récepteurs du HCV, cependant aucune réplication virale n'a été observée (Liu *et al.*, 2019). Dans les macrophages, Core et NS3 activent la voie de signalisation de TLR2 conduisant à la production de TNF- α (Dolganiuc *et al.*, 2004). La présence d'ARN du HCV active la voie de signalisation de TLR7 *via* MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*) menant à la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β (Figure 18) (Negash *et al.*, 2013). Bien qu'encore controversée, l'infection des lymphocytes B par le HCV a été démontrée plusieurs fois *in vitro* et *in vivo* (Dai *et al.*, 2016; Durand *et al.*, 2010; Pham *et al.*, 2008; Sung *et al.*, 2003). Dans les lymphocytes B et les hépatocytes infectés par le HCV, NS5A active le promoteur de TLR4 et augmente son expression. La surexpression de TLR4 induit l'activation des lymphocytes B ainsi que la production et la sécrétion d'IFN- β et d'IL-6 (Machida *et al.*, 2006). JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) phosphoryle le facteur de transcription c-Jun, activant l'expression de gènes pro-inflammatoires.

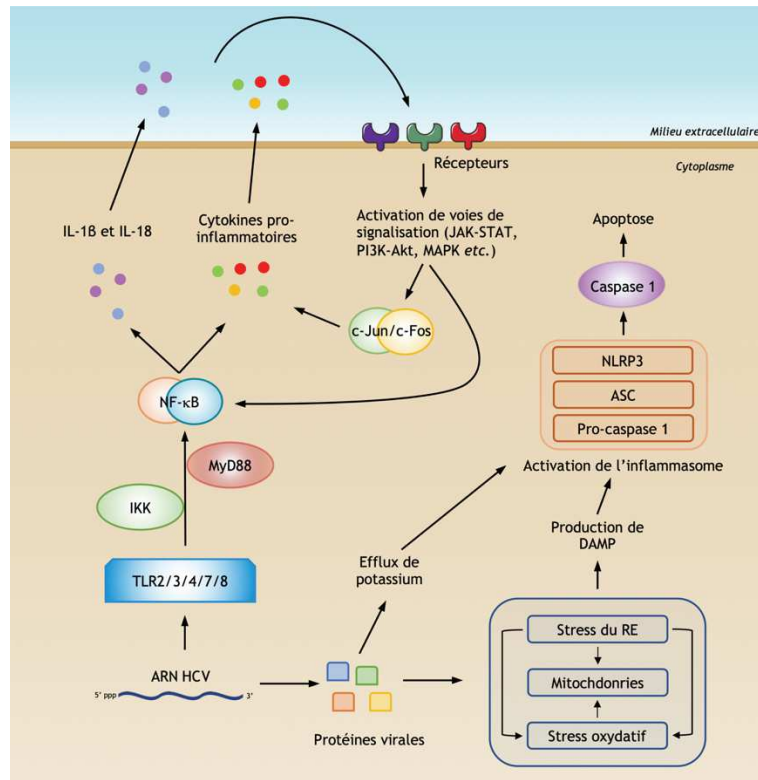


Figure 18 : Induction de l'inflammation de par le HCV. L'ARN du HCV active différents TLR (*Toll-like receptor*) menant à l'activation de NF- κ B et à la sécrétion d'IL-1 β , d'IL-18 et de cytokines pro-inflammatoires. L'interaction des cytokines avec leur récepteur induit l'activation de différentes voies de signalisation menant à une réponse inflammatoire par l'activation de NF- κ B et du facteur de transcription AP-1 composé de c-Jun et c-Fos. Les protéines du HCV provoquent un efflux de potassium ainsi qu'un stress oxydatif et le stress du reticulum endoplasmique (RE) menant à la production de DAMP (*Damage associated molecular pattern*), causant l'activation de l'inflammasome. Le précurseur Pro-caspase 1 est maturé par l'inflammasome en Caspase 1 menant à l'apoptose cellulaire (adapté de Li *et al.*, 2018).

Les protéines Core et NS5A du HCV induisent l'expression et l'activation de JNK dans les hépatocytes (Hassan *et al.*, 2009; Kuo *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2003). L'infection par le HCV induit également la surexpression de PKR qui induit alors la phosphorylation de JNK ainsi que la surexpression et l'activation de c-Jun et c-Fos, les deux facteurs de transcription formant le complexe AP-1 (Watanabe *et al.*, 2013). La suractivation de JNK et de c-Jun lors de l'infection par le HCV favorise d'une part l'état inflammatoire hépatique, mais également la progression vers le carcinome hépatocellulaire en induisant l'expression de la cycline D1 qui promeut la transition de la phase G0 vers la phase G1 lors du cycle cellulaire (Schwabe *et al.*, 2003).

ii. Inflammasome et infection par le HCV

L'inflammasome est un large complexe multiprotéique qui se forme en réponse à la détection de PAMP ou de troubles métaboliques et inflammatoires et induit l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 (Martinon *et al.*, 2002; Szabo & Petrasek, 2015). Pour permettre l'expression et la sécrétion des formes matures d'IL-1 β et d'IL-18, deux voies de signalisation distinctes sont nécessaires. Le premier signal est la détection d'un PAMP par un TLR induisant l'activation de NF- κ B et l'expression des précurseurs Pro-IL-1 β et Pro-IL-18 ainsi que la protéine NLRP3 (*NLR family pyrin domain containing 3*) faisant partie de la famille des NLR (*Nod-like receptor*) (Figure 18). Plusieurs membres de la famille des NLR, dont NLRP1, 2, 3, 6, 12 ainsi que NLRC4, NOD2 et ASC ont été décrits comme pouvant activer Caspase 1. Cependant, leur rôle reste très peu décrit pour la majorité de ces protéines et NLRP3 est à ce jour la protéine la mieux décrite. Le second signal consiste en l'activation de NLRP3 qui active à son tour Caspase 1. NLRP3 peut être activée par trois signaux différents : la détection de DAMP (*Danger associated molecular pattern*) induisant une déplétion de K⁺ intracellulaire par Pannexine 1, l'endocytose d'acide urique ou de cholestérol conduisant à des dommages lysosomaux et à l'activation de Cathepsine B ou la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) lors de stress cellulaires conduisant à la libération de TXNIP (*Thioredoxin interacting protein*) de son complexe formé avec la Thiorédoxine, et l'activation de NLRP3 par TXNIP. Une fois activée, NLRP3 interagit avec une molécule adaptatrice ASC (*Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) ainsi qu'au précurseur inactif Pro-Caspase 1. L'inflammasome forme ensuite des oligomères activant Caspase-1. Un inflammasome composé de l'interaction entre AIM2 (*Absent in melanoma 2*) et ASC peut également se former après détection d'un ARN viral par RIG-I afin d'activer Caspase-1 (Poeck *et al.*, 2010). La forme active de Caspase 1

initie la maturation des cytokines IL-1 β et IL-18 qui sont ensuite sécrétées (Schroder & Tschopp, 2010). Les patients infectés par le HCV ont une augmentation d'IL-1 β et d'IL-18 dans le plasma indiquant une activation de l'inflammasome par le virus (Capone *et al.*, 2014). Cependant, les mécanismes par lesquels le HCV active l'inflammasome ainsi que le type cellulaire impliqué restent encore largement débattus.

Bien qu'IL-1 β et IL-18 soit détectées dans le plasma de patients infectés par le HCV, IL-1 β n'est détectée que dans le foie de patients cirrhotiques et n'est pas détectée dans le foie de patients HCV n'ayant pas de fibrose (Chattergoon *et al.*, 2011; Negash *et al.*, 2013). L'interaction du HCV avec les macrophages hépatiques, appelés cellules de Kupffer (CK) stimule la production des formes matures et immatures d'IL-1 β *via* l'activation de l'inflammasome NLRP3. Le premier signal est induit par la détection de l'ARN viral par TLR7 (Chattergoon *et al.*, 2014; Negash *et al.*, 2013). La protéine Core stimule l'assemblage et l'activation de l'inflammasome ainsi que la maturation de Caspase 1 en modifiant le flux de calcium intracellulaire *via* la voie de signalisation de Phospholipase C (Negash *et al.*, 2019). La viroporine p7 permet également la production d'IL-1 β lorsqu'elle est exprimée seule dans les CK, probablement par modification du pH intracellulaire. Cependant, elle joue un rôle mineur dans l'activation de l'inflammasome lorsque les CK sont mises en contact de virions HCV (Farag *et al.*, 2017; Negash *et al.*, 2019). La transfection de l'ARN du HCV dans les monocytes et les CK induit la production de ROS menant à l'activation de l'inflammasome NLRP3 de manière indépendante de RIG-I (Chen *et al.*, 2014). En revanche, l'infection par le HCV n'induit aucune activation de l'inflammasome dans les hépatocytes (Chen *et al.*, 2014; Shrivastava *et al.*, 2013). L'activation de l'inflammasome par le HCV a donc principalement lieu dans les monocytes et les CK et les mécanismes d'activation semblent varier selon le type cellulaire.

iii. Le rôle du microenvironnement cellulaire dans l'inflammation hépatique

Les hépatocytes forment le type cellulaire le plus largement retrouvé dans le foie. Cependant, les CK qui représentent 15 % des cellules hépatiques, ainsi que les cellules hépatiques stellaires (CHS) jouent un rôle majeur dans l'inflammation hépatique chronique et dans la progression vers la fibrose hépatique lors d'une infection par le HCV (**Figure 19**).

Introduction – Partie I

Dans les CK, l'internalisation par phagocytose du HCV ou d'exosomes contenant l'ARN du HCV induit la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires par l'inflammasome (Negash *et al.*, 2013, 2019 ; cf "Inflammasome et infection par le HCV"). Les CHS sont généralement activées par le TGF- β (*Transforming growth factor beta*) induisant une production excessive de collagène ainsi qu'une réorganisation de la matrice extracellulaire (Atzori *et al.*, 2009). L'activation prolongée des CHS chez les patients infectés par le HCV est fortement impliquée dans la progression vers la fibrose hépatique (Akil *et al.*, 2019; Dawood *et al.*, 2018). Les activations croisées entre les hépatocytes répliquant le HCV, les CK et les CHS induisent une aggravation et une prolongation de l'inflammation hépatique menant à terme à l'apparition de maladies hépatiques.

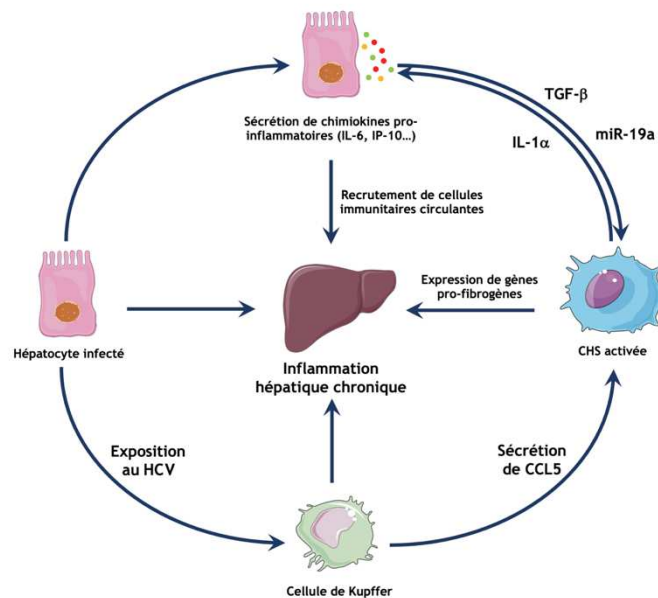


Figure 19 : Rôle du microenvironnement cellulaire dans l'inflammation hépatique chronique. Les différents types cellulaires impliqués dans l'inflammation hépatique sont représentés. Lors d'une infection par le HCV, les hépatocytes sécrètent du TGF- β et des exosomes contenant le miR-19a induisant l'activation des cellules hépatiques stellaires (CHS). Les CHS sont également activées par les cellules de Kupffer qui sécrètent CCL5 lorsqu'elles sont exposées au HCV. Les CHS activées expriment des gènes pro-fibrogènes menant à la fibrose hépatique. Les hépatocytes infectés sécrètent également des chimiokines pro-inflammatoires qui recrutent des cellules immunitaires circulantes, telles que des cellules *Natural killer*, des cellules dendritiques et des monocytes qui exacerbent la réponse inflammatoire hépatique (adapté de Li *et al.*, 2018).

Lors d'une infection par le HCV, les hépatocytes infectés et les CHS s'activent mutuellement. Un système de co-culture contenant des hépatocytes infectés par le HCV et des CHS a montré que l'infection du HCV induit l'expression et la sécrétion de TGF- β par les hépatocytes. La production de TGF- β par les hépatocytes infectés est due à l'activation de la

voie NF- κ B par la protéine virale E2 (Jee *et al.*, 2015). La stimulation par le TGF- β entraîne une activation des CHS et une modulation de l'expression de gènes, avec une surexpression de gènes pro-fibrogéniques tels que procollagène α (I) et α (III) et MMP3 (*Matrix metalloproteinase 3*), ainsi qu'une diminution de l'expression de gènes fibrolytiques tel que MMP13 (*Matrix metalloproteinase 13*) (Schulze-Krebs *et al.*, 2005). Cependant, l'activité du TGF- β seul ne permet qu'une activation de 50 % de l'activité fibrogène, ce qui implique que d'autres éléments sont nécessaires à cette activité. Les hépatocytes infectés sécrètent des exosomes pouvant contenir différents types d'acides nucléiques. Une étude a montré que la stimulation de CHS avec des exosomes sécrétés par des hépatocytes infectés par le HCV induit l'expression de marqueurs fibrogènes (Devhare *et al.*, 2017). Cependant, le HCV ne pouvant ni entrer, ni se répliquer dans les CHS, l'activation des CHS par le génome du HCV est peu probable (Florimond *et al.*, 2015). En revanche, des exosomes dérivés d'hépatocytes infectés par le HCV transportent le miR-19a dans les CHS. L'internalisation du miR-19a dans les CHS induit une diminution de l'expression de SOCS3 menant à une activation des CHS et la surexpression de marqueurs fibrogènes par la voie STAT3/TGF- β 1/Smad3 (Dehavre *et al.*, 2017). Les CHS activées induisent également l'expression de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires par les hépatocytes infectés (**Figure 19**). C/EBP- β est surexprimé par les hépatocytes infectés et les CHS activées sécrètent IL-1 α ce qui active C/EBP- β et l'expression par les hépatocytes de cytokines et de chimiokines telles qu'IL-6, IL-8 et les MIP-1 α et -1 β (Nishitsuji *et al.*, 2013). Lorsqu'elles sont exposées au HCV, les CK sécrètent la chimiokine CCL5. L'incubation de CHS avec un milieu conditionné par des CK exposées au HCV et contenant CCL5 induit l'activation des CHS et l'expression de marqueurs pro-fibrogènes (Sasaki *et al.*, 2017).

En plus de leurs activations croisées, la sécrétion de chimiokines pro-inflammatoires recrute des cellules immunitaires circulantes au niveau du site d'infection, exacerbant encore la réponse inflammatoire hépatique (Takahashi *et al.*, 2010). Le microenvironnement inflammatoire induit par tous ces facteurs induit fortement la progression de la maladie hépatique.

iv. Le stress oxydatif

Dans les hépatocytes, les mitochondries sont la source majeure de ROS. Lors d'un stress oxydatif, l'accumulation de ROS contribue fortement à l'inflammation, la fibrogénèse et la progression vers le CHC (De Andrade *et al.*, 2015). L'infection par le HCV déclenche la production de ROS et le stress oxydatif, participant à l'inflammation hépatique chronique mais également à des pathologies extra-hépatiques comme le diabète de type 2 (Serfaty & Capeau, 2009; Vanni *et al.*, 2016) ou des maladies cardiovasculaires (Hsu *et al.*, 2014; Petta *et al.*, 2016). La plupart des protéines du HCV sont impliquées dans le stress oxydatif. La protéine Core est la plus impliquée dans la perturbation des flux de calcium et dans la production de ROS. Core peut être retrouvée à la membrane externe des mitochondries où elle induit une augmentation de l'influx de Ca^{2+} mitochondrial menant à une oxydation du glutathion et au maintien d'un environnement mitochondrial oxydatif (Korenaga *et al.*, 2005). Différents domaines de Core mènent au stress oxydatif par des mécanismes multiples. Le domaine N-terminal (36 aa) induit, dépendamment de l'expression de TGF- β , l'expression de NOX1 (*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase*) et NOX4 qui contribuent à la production de ROS. Le reste de la protéine active l'expression de la protéine 2E1 du cytochrome p450, impliquée dans la génération de ROS, ainsi que de ERO1A (*Endoplasmic reticulum oxidoreductin 1 α*) qui induit l'efflux de Ca^{2+} du RE vers la mitochondrie menant à la production d'anions superoxydes O_2^{\bullet} , principale espèce radicalaire mitochondriale (Ivanov *et al.*, 2015). NS5A active la production de ROS par modifications du taux de Ca^{2+} , menant à l'activation de NF- κ B et de STAT3 (Gong *et al.*, 2001). Cependant, ces processus sont hautement régulés, car la surproduction de ROS lors du traitement de cellules, exprimant Core ou NS5A, avec du ménadione, un générateur d'anions superoxydes, induit la dégradation de Core et de NS5A *via* la protéine adaptatrice de l'autophagie p62 et améliore la survie cellulaire (Ríos-Ocampo *et al.*, 2019, 2020). Dans les CHS, E2 contribue à la fibrose hépatique en augmentant la production de ROS liée au collagène- α (Ming-Ju *et al.*, 2011). NS3 active les NOX dans les monocytes menant à une augmentation de la production de ROS (Bureau *et al.*, 2001). Le stress oxydatif lors d'une infection par le HCV induit l'activation de STAT3 impliquant plusieurs kinases dont p38 MAPK, JNK, JAK2 et Src. La production de ROS et le stress oxydatif contribuent à l'inflammation hépatique chronique ainsi qu'à l'expression de gènes impliqués dans la progression vers le CHC (Medvedev *et al.*, 2016).

d. L'immunité adaptative

i. Les anticorps neutralisants

L'étude du sérum de patients infectés de manière chronique par le HCV a montré la présence d'anticorps dirigés spécifiquement contre des protéines virales structurales et non-structurales. Cependant, l'apparition de ces anticorps chez les patients chroniques est retardée et la quantité détectée lors de la phase aiguë est très faible (Chen *et al.*, 1999; Chien *et al.*, 1993; Ching *et al.*, 1992). Les premières études réalisées sur des chimpanzés ont permis de montrer que les anticorps neutralisants produits lors d'une infection par le HCV ciblent la région hypervariable 1 (RHV1) de la glycoprotéine E2 (Farci *et al.*, 1994, 1996). Chez l'humain, l'apparition d'anticorps neutralisants lors de la phase aiguë de l'infection favorise le contrôle de l'infection virale et la clairance du virus (Lavillette *et al.*, 2005; Pestka *et al.*, 2007). Cependant, leur présence n'est pas strictement nécessaire et leur action seule n'est pas suffisante pour éliminer le HCV (Lechner *et al.*, 2000; Logvinoff *et al.*, 2004; Thimme *et al.*, 2002). Chez les patients infectés de manière chronique par le HCV, l'apparition des anticorps neutralisants est retardée (Osburn *et al.*, 2014). La RHV1 de E2 est une région sujette à beaucoup de mutations lors de la réplication virale donnant naissance à des quasi-espèces virales (Farci *et al.*, 2000). De ce fait, l'apparition précoce d'anticorps neutralisants permet de diminuer le taux de quasi-espèces virales échappant à l'immunité et favorise la clairance virale. Chez les patients chroniques, il a été observé que l'évolution des séquences des épitopes ciblées par les anticorps neutralisants correspondait à l'évolution des mutations de RHV1 de E2, mais de manière retardée (von Hahn *et al.*, 2007). La pression immunitaire exercée par les anticorps neutralisants induit une évolution constante des quasi-espèces du HCV afin d'échapper au système immunitaire. Récemment, des anticorps hautement neutralisants ciblant des régions plus conservées de E2 ont été décrits (Kinchen *et al.*, 2018). Du fait de la conservation des épitopes ciblés, ces anticorps peuvent neutraliser une quantité largement plus importante de quasi-espèces du HCV. Depuis quelques années, la caractérisation immunologique de ces anticorps ainsi que l'étude de l'immunogénicité nécessaire à leur production par l'organisme ont vivement relancé la recherche dans le but d'établir un vaccin contre le HCV (Keck *et al.*, 2018; Kinchen *et al.*, 2018).

ii. Les lymphocytes T

La réponse immunitaire des lymphocytes T (LT) est importante pour le devenir de l'infection aiguë, la clairance virale étant largement associée à l'action de LT *helper* et cytotoxiques (Grakoui *et al.*, 2003; Thimme *et al.*, 2001). L'élimination du virus est corrélée à la présence de LT CD4⁺ spécifiques du HCV influant sur la régulation de l'expression de gènes des LT CD8⁺ (Thimme *et al.*, 2001; Wolski *et al.*, 2017). Plus particulièrement, la sécrétion d'IL-21 par les LT CD4⁺ permet de maintenir l'action antivirale des LT CD8⁺ et la présence d'IL-21 dans le plasma de patients est également corrélée à la clairance virale (Elsaesser *et al.*, 2009; Kared *et al.*, 2013). La seule présence de LT CD4⁺ lors de l'infection aiguë ne permet pas de définir l'issue de l'infection, les LT CD4⁺ étant toujours détectés lors de cette phase (Schulze zur Wiesch *et al.*, 2012). Cependant, la puissance de la réponse des LT CD4⁺ ainsi que leur prolifération et leur persistance sont déterminantes pour l'élimination du HCV (Chang *et al.*, 2001b).

Lors d'une infection chronique par le HCV, les LT CD8⁺ persistent tandis que la prolifération des LT CD4⁺ diminue très fortement (Chang *et al.*, 2001b). Cependant, le phénomène d'épuisement des LT CD8⁺, généralement dû à une stimulation antigénique persistante, est très largement observé (Paley *et al.*, 2012; Wieland *et al.*, 2017). La voie de signalisation inhibitrice de PD-1 (*Programmed cell death 1*) est l'élément central de l'épuisement des LT CD8⁺ et responsable de la diminution de la sécrétion de cytokines ainsi que de leur prolifération (Moskophidis *et al.*, 1993; Urbani *et al.*, 2006). Des observations chez les patients HCV chroniques ont permis la séparation de l'épuisement des LT CD8⁺ en deux catégories. Une partie des LT CD8⁺, appelée *memory-like*, continue de proliférer et exprime une faible quantité de PD-1 ainsi qu'une forte quantité de CD127, un marqueur des lymphocytes T mémoires (Utzschneider *et al.*, 2016; Wieland *et al.*, 2017). L'autre catégorie correspond à un épuisement complet des LT CD8⁺ qui expriment une forte quantité de PD-1 et ne prolifèrent pratiquement plus. Une étude montre que, chez des patients HCV chroniques, les LT CD8⁺ intra-hépatiques appartiennent à la deuxième catégorie (Paley *et al.*, 2012). Les LT CD8⁺ spécifiques du HCV jouent un rôle dans le contrôle de l'infection virale par deux mécanismes. Le premier est une activité cytotoxique induisant la mort des cellules infectées par apoptose. Le second mécanisme est la production et la sécrétion de cytokines antivirales et pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ et le TNF- α permettant le contrôle de l'infection virale (Neumann-Haefelin & Thimme, 2013).

III. RACK1, support de régulation de l'inflammation

RACK1 a d'abord été décrite comme interagissant avec la forme activée de PKC β II (Protéine kinase C bêta II) (Ron *et al.*, 1994). RACK1 est une protéine d'échafaudage, sans activité enzymatique, impliquée dans une multitude de voies de signalisation régulant le développement embryonnaire, le vieillissement, le développement de cancer ou encore l'immunité innée. De plus, RACK1 peut se lier à la sous-unité 40S du ribosome où elle est nécessaire à la traduction de virus possédant un IRES, dont le HCV, l'EMCV (*Encephalomyocarditis virus*) et le CrPV (LaFontaine *et al.*, 2020; Majzoub *et al.*, 2014). RACK1 est également impliquée dans différentes étapes de cycles viraux. Elle participe à la réplication du virus de la dengue et le virus Zika et est requise pour le bourgeonnement des particules virales du virus Influenza A (Demirov *et al.*, 2012; Hafirassou *et al.*, 2017). Le contrôle de son expression est important, car l'expression de RACK1 est souvent dérégulée lors de cancer et impliquée dans la prolifération des cellules (Li & Xie, 2015). Cependant, le rôle inhibiteur ou activateur de RACK1 dans certaines voies de signalisation semble dépendant du type cellulaire impliqué. Il est de ce fait difficile d'établir des corrélations directes entre les observations faites sur un type cellulaire à partir de données déjà obtenues dans un autre type cellulaire.

1. Structure de RACK1

RACK1 fait partie de la famille de protéine à domaines WD40 répétés. Un domaine WD40 est un motif structurel d'environ 40 acides aminés contenant un dipeptide glycine-histidine, situé entre 11 et 24 aa de l'extrémité N-terminale, et terminé par un tryptophane (W) et un acide aspartique (D) à l'extrémité C-terminale (Neer *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1999). La répétition des domaines WD40 donne à la protéine une structure en β -propeller où chaque lame est composée de 4 feuillets β antiparallèles. RACK1 est composée de 7 répétitions du domaine WD40 et donc de 7 lames (**Figure 20**). La structure de RACK1 est également stabilisée par la présence d'un motif « Velcro » dans la septième lame et qui permet de connecter les extrémités N- et C-terminales (Ruiz Carrillo *et al.*, 2012). Les protéines à domaines WD40 sont impliquées dans une grande variété de mécanismes cellulaires et de signalisations mais ne portent aucune activité enzymatique (Xu & Min, 2011). Le domaine WD40 joue le rôle de chaperonne dans les interactions protéine-protéine et fait partie des domaines les plus impliqués et décrits dans les interactions protéiques eucaryotes (Stirnimann *et al.*, 2010).

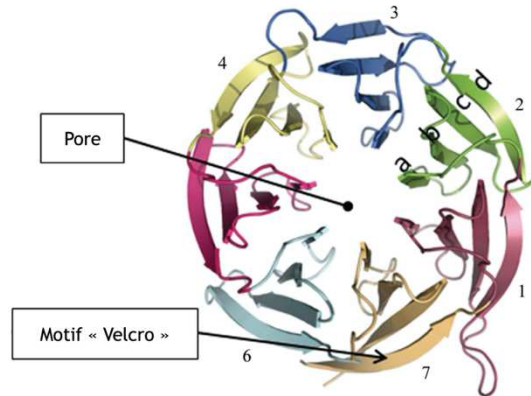


Figure 20 : Représentation de la structure cristallographique de la protéine RACK1 humaine. Les localisations du pore et du motif « Velcro » sont représentées. Chaque lame est numérotée de 1 à 7 à partir de l'extrémité N-terminale. Les feuillets β antiparallèles sont nommés par une lettre allant de a à d (adapté de Ruiz Carillo *et al.*, 2012).

2. Régulation de l'expression de RACK1

Afin d'étudier les éléments régulateurs présents dans la région promotrice du gène *GNB2L1* codant RACK1 ainsi que leur fonction, une séquence de 2 kpb (kilo paire de base) correspondant à la région 5' du gène *GNB2L1* humain a été clonée (Del Vecchio *et al.*, 2009). De manière similaire aux observations faites sur le gène de souris, le gène *GNB2L1* contient 2 sites d'initiation de la transcription situés 395 nt et 328 nt en amont de l'ATG initiateur. L'analyse bio-informatique a également permis le repérage de différentes séquences consensus impliquées dans le recrutement de facteurs de transcription spécifiques (Figure 21). Certains sites permettent le recrutement de facteurs de transcription tissus spécifiques comme le site de liaison à Hand1/E47 impliqué dans la différenciation des cardiomyocytes (Risebro *et al.*, 2006) et les sites de liaison à Elk-1 et Nkx2-5 impliqués dans le développement cardiaque (Harvey *et al.*, 1999). Le promoteur contient des sites permettant le recrutement d'autres facteurs de transcription comme Oct-1, Elk-1 ou le récepteur des glucocorticoïdes $GR\alpha$. De manière intéressante, le promoteur de *GNB2L1* contient également 4 sites de liaisons à c-Rel, un facteur de transcription de la voie NF- κ B. Des sites de liaison à NF- κ B ont par ailleurs également été identifiés chez le cochon et la souris. L'étude fonctionnelle du promoteur de *GNB2L1* dans une lignée de monocytes a montré que l'activation directe ou indirecte de NF- κ B par différents stimuli induit l'activation de la transcription à partir du

promoteur de *GNB2L1* et l'expression du gène rapporteur (Del Vecchio *et al.*, 2009). De ce fait, l'expression de *RACK1* est directement liée à l'activation de NF- κ B et à l'immunité innée.

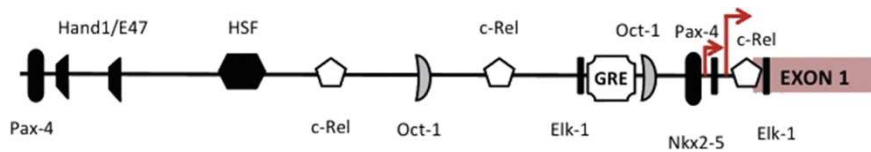


Figure 21 : Analyse bioinformatique des différents éléments compris dans le promoteur de *GNB2L1*. Les sites de liaison des différents facteurs de transcription ainsi que les deux sites d'initiation de la transcription (flèches rouges) sont représentés (adapté de Buoso *et al.*, 2017).

3. Implication de *RACK1* dans différents cancers

RACK1 interagit avec un grand nombre de protéines à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau. Les rôles que *RACK1* exerce sur les protéines cibles sont : la translocation, l'activation ou l'inhibition, la formation ou la séparation de complexes protéiques et leur dégradation ou leur stabilisation (pour une revue voir Li & Xie, 2015). La diversité des rôles de *RACK1* sur ses partenaires protéiques est également retrouvée sur son rôle dans différents types de cancer (Figure 22). L'analyse du transcriptome de différentes tumeurs a mis en évidence que dans certains cancers l'expression de *RACK1* est augmentée (poumons, CHC) tandis que dans d'autres elle est diminuée (estomac). Dans les cancers où elle est surexprimée, *RACK1* induit la prolifération cellulaire ainsi que la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et la migration des cellules cancéreuses. L'augmentation de son expression est un marqueur de mauvais pronostic de survie (Nagashio *et al.*, 2010; Ruan *et al.*, 2012). A l'inverse, dans le cancer gastrique, *RACK1* diminue le pouvoir tumoral des cellules en inhibant la voie de signalisation Wnt/ β -caténine (Deng *et al.*, 2012).

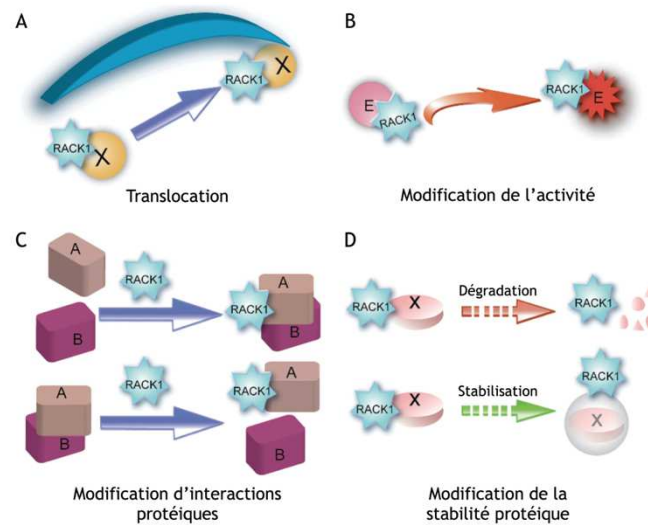


Figure 22 : Les différents effets de l'interaction de RACK1 avec ses partenaires. (A) RACK1 peut transporter son partenaire et modifier sa localisation. (B) RACK1 peut modifier l'activité de ses partenaires enzymatiques en induisant leur activation. (C) RACK1 peut modifier les interactions protéiques en permettant ou en prévenant la formation de complexe. (D) RACK1 peut modifier la stabilité d'un partenaire en induisant sa dégradation ou à l'inverse en favorisant sa stabilité (adapté de Li & Xie, 2014).

L'étude de l'implication de RACK1 dans la croissance du CHC a mis en évidence trois rôles distincts. RACK1 agit directement sur la voie MAPK en interagissant avec MKK7 induisant l'activation de MKK7/JNK et la prolifération cellulaire. De plus, cette interaction confère une résistance à l'apoptose induite par Fas ou TRAIL (*Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) (Guo *et al.*, 2013). Chez la souris, une étude a également montré que RACK1 induit la prolifération et la migration cellulaire *via* la voie de signalisation PI3K/Rac1 (Wu *et al.*, 2013). RACK1 sous sa forme ribosomique est également impliquée dans la prolifération du CHC. Elle recrute PKC β II qui phosphoryle eIF4E induisant une spécialisation de l'initiation de la traduction tournée vers des gènes impliqués dans la survie cellulaire et la résistance aux traitements (Ruan *et al.*, 2012). Le rôle direct de la fraction ribosomique de RACK1 renforce l'intérêt de l'étude de sa fonction ribosomique précise et de ses implications dans différentes pathologies.

4. RACK1 et le ribosome

L'interaction de RACK1 avec le ribosome est conservée chez les eucaryotes et a été décrite chez la levure, la drosophile et les mammifères (Anger *et al.*, 2013; Ben-Shem *et al.*, 2010; Voorhees *et al.*, 2014). RACK1 est logée dans une poche située à l'arrière de la tête de la sous-unité ribosomique 40S où elle interagit avec différentes protéines ribosomiques ainsi que l'ARN ribosomique (ARNr) 18S (**Figure 23**) (Nielsen *et al.*, 2017).

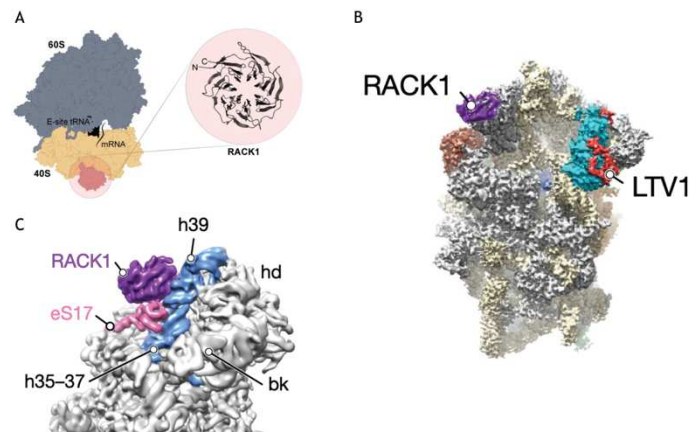


Figure 23 : Interaction de RACK1 avec la sous-unité ribosomique 40S. (A) Représentation schématique de l'interaction de RACK1 avec le ribosome. La grande sous-unité ribosomique 60S est représentée en gris, la petite sous-unité 40S en jaune et RACK1 en rose. La structure de RACK1 est également représentée (adapté de Johnson *et al.*, 2019). (B) Reconstruction par cryo-microscopie électronique d'une particule pré-40S. Les protéines RACK1 et LTV1 sont représentées en interaction avec la sous-unité ribosomique 40S. (C) Représentation détaillée du site d'interaction de RACK1 avec la sous-unité ribosomique 40S (adapté de Ameismeier *et al.*, 2018).

L'association de RACK1 au ribosome permet la régulation de l'initiation de la traduction. La forme phosphorylée de PKC β II est recrutée au ribosome, par interaction avec RACK1, et phosphoryle eIF6 induisant la formation du ribosome actif 80S par l'assemblage des sous-unités ribosomiques 40S et 60S (Ceci *et al.*, 2003; Grosso *et al.*, 2008). Le recrutement de PKC β II est aussi impliqué dans la phosphorylation d'eIF4E retrouvée notamment dans le CHC et menant à une spécialisation du ribosome pour la traduction d'ARNm impliqués dans la croissance cellulaire (Ruan *et al.*, 2012). RACK1 recrute également d'autres kinases à la surface du ribosome. La kinase Src phosphoryle RACK1 sur les résidus Tyr228 et Tyr246, et cette dernière favorise l'interaction de Src avec RACK1 (Chang *et al.*, 2001a, 2002). L'interaction de RACK1 et Src à la surface du ribosome n'a jamais été montrée, mais le site d'interaction de RACK1 avec Src ainsi que les deux tyrosines phosphorylées par Src se trouvent sur la face exposée de RACK1 quand elle est liée au ribosome. De plus, RACK1 et Src sont impliquées dans

la régulation de la traduction d'ARNm spécifiques. RACK1 a un rôle inhibiteur sur l'activité de Src, induisant une diminution de son activité kinase (Miller *et al.*, 2004). Src régule la traduction spécifique de certains gènes. Par exemple, la phosphorylation de hnRNP K par Src inhibe l'interaction de hnRNP K avec la région 3' UTR de l'ARNm de LOX supprimant alors l'inhibition de sa traduction (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). ZBP1 (*Zipcode binding protein 1*) interagit avec l'ARNm de l'actine- β et inhibe sa traduction (Ceci *et al.*, 2012). RACK1, lorsque liée au ribosome, interagit avec le complexe ZBP1/ARNm actine- β et induit le relargage de ZBP1 pour permettre la traduction de l'actine- β . L'interaction de ZBP1 et de RACK1 fait intervenir la Tyr246 de RACK1, dont la phosphorylation est régulée par Src. Src phosphoryle une tyrosine de ZBP1, inhibant son interaction avec l'ARNm de l'actine- β (Hüttelmaier *et al.*, 2005). La dynamique d'interaction de RACK1 avec Src et ZBP1 permet la régulation spatiale de la traduction de l'ARNm de l'actine- β .

Lors d'une stimulation de la voie de signalisation PKC par du TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate), RACK1 recrute JNK au ribosome et permet sa phosphorylation et son activation par PKC (López-Bergami *et al.*, 2005). Au ribosome, JNK activée phosphoryle le facteur d'élongation de la traduction eEF1A2 (*Eukaryotic translation elongation factor 1A isoform 2*) induisant la dégradation par le protéasome des protéines nouvellement synthétisées. Lors d'un stress, ici induit par le TPA, la quantité de protéines mal repliées augmente (Hartl *et al.*, 2011). Le complexe PKC/RACK1/eEF1A2 contrôle le repliement des protéines et favorise la dégradation des protéines nouvellement synthétisées mal repliées (López-Bergami *et al.*, 2005).

5. RACK1 et voies de signalisation

RACK1 a été décrite comme impliquée dans de nombreuses voies de signalisation dont des voies de l'immunité innée. Cependant, son rôle au sein d'une même voie peut parfois être opposé selon le type cellulaire étudié. Dans la voie de l'IFN de type I, RACK1 forme un complexe avec IFNAR, STAT1 et Tyk2 (Haro *et al.*, 2004). La formation de ce complexe est nécessaire à l'activation par phosphorylation de STAT1 et STAT2 dans des lignées de lymphocytes B. En effet, la mutation de RACK1 empêchant l'interaction de RACK1 avec IFNAR induit une forte baisse de la phosphorylation de STAT1 et de STAT2 après stimulation à l'IFN- α dans ces lignées (Usacheva *et al.*, 2001). Cependant, des données non-publiées obtenues

par notre laboratoire montrent que la stimulation par l'IFN- α de cellules Huh7 n'exprimant plus RACK1 induit une phosphorylation de STAT1 plus forte et prolongée, sans que l'état de phosphorylation basal en l'absence de traitement ne soit modifié.

La stimulation de cellules à l'insuline induit l'activation de STAT3 *via* les récepteurs IR (*Insulin receptor*) et IGF-1R (*Insulin-like growth factor-1 receptor*). RACK1 forme un complexe avec IR/IGF-1R et STAT3 nécessaire à la phosphorylation de STAT3 dans différents types cellulaires (Zhang *et al.*, 2006). La suractivation de STAT3 a été décrite dans différents cancers et une surexpression de RACK1 pourrait y contribuer, induisant l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (Bowman *et al.*, 2000; Buettner *et al.*, 2002).

La voie de signalisation ERK/JNK/c-Jun est activée dans un grand nombre de cancers (Lopez-Bergami *et al.*, 2010; Prusty & Das, 2005; Sato *et al.*, 2015) et plusieurs rôles ont été décrits pour RACK1 dans la régulation de cette voie. Le promoteur de RACK1 contient un élément de réponse à c-Jun. De ce fait, l'activation de c-Jun favorise l'expression de RACK1 (Lopez-Bergami *et al.*, 2007). Le complexe RACK1/PKC induit la phosphorylation du résidu Ser129 de JNK, favorisant alors l'activation de JNK par MKK4 ou MKK7 et l'activation subséquente de c-Jun (**Figure 24**) (López-Bergami *et al.*, 2005). L'activation de cette voie est en partie régulée par TRIM45 (*Tripartite motif containing 45*) dont l'expression est activée par c-Jun (Sato *et al.*, 2015). TRIM45 interagit avec RACK1 et empêche la formation du complexe RACK1/PKC, formant une boucle de réponse négative permettant de diminuer l'activation de JNK par RACK1. RACK1 régule également la stabilité de c-Jun en interagissant avec la forme non-phosphorylée de c-Jun et FBW7 (*F-Box & WD repeat domain containing 7*), induisant l'ubiquitinylation de c-Jun par FBW7 et sa dégradation (Zhang *et al.*, 2012). La phosphorylation du résidu Ser63 de c-Jun par JNK empêche la formation du complexe de dégradation et améliore sa stabilité.

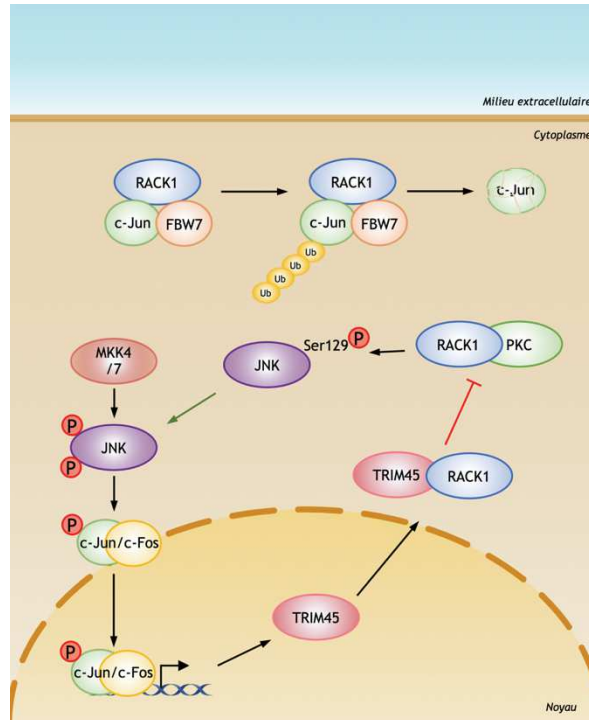


Figure 24 : Régulation de l'activation de c-Jun par RACK1. Les différentes régulations de l'activation de c-Jun par RACK1 sont schématisées. RACK1 favorise l'interaction de la forme non-phosphorylée de c-Jun avec FBW7 (*F-Box & WD repeat domain containing 7*) qui favorise son ubiquitinylation et sa dégradation. RACK1 interagit avec PKC (Protéine kinase C) et induit la phosphorylation de JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) sur la sérine 129. Cette forme phosphorylée de JNK est plus facilement recrutée par MKK4/7 pour induire l'activation de JNK par phosphorylation. La forme activée de JNK phosphoryle ensuite le facteur de transcription AP-1 composé d'un hétérodimère de c-Jun et de c-Fos. AP-1 active l'expression de TRIM45 qui forme une boucle de contrôle négatif de l'activation de JNK en interagissant avec RACK1 et en inhibant son interaction avec PKC.

L'expression de RACK1 est diminuée chez les patients atteints de cancer gastrique. La bactérie *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) est le facteur étiologique majeur du cancer gastrique (Malfertheiner *et al.*, 2017). Une étude a récemment montré que l'infection par *H. pylori* est responsable d'une diminution de l'expression de RACK1 dans les cellules gastriques. L'observation a été réalisée à partir de tissus tumoraux et adjacents provenant de patients. La diminution de l'expression de RACK1 par l'infection par *H. pylori* a pu être reproduite *in vitro* dans des cellules d'épithélium gastrique GES-1 cultivées en présence d'une souche de *H. pylori*. L'étude a montré que la diminution de l'expression de RACK1 est indépendante de CagA (*cytotoxin-associated gene A*) et VacA (*vacuolating cytotoxin A*), les deux facteurs de virulence de *H. pylori*, cependant le mécanisme reste inconnu. La diminution de RACK1 est accompagnée d'une surexpression de l'intégrine $\beta 1$ et de l'activation de NF- κ B, induisant l'inflammation chronique menant à la carcinogenèse (Hu *et al.*, 2019b). De plus, RACK1 est

directement impliquée dans la régulation de l'activation de NF- κ B. La stimulation de cellules avec du TNF- α induit l'interaction de RACK1 avec le complexe IKK, empêchant alors le recrutement de TRAF2 et diminuant l'activation de NF- κ B (Yao *et al.*, 2014).

Récemment une étude a montré l'implication de RACK1 dans l'atténuation de l'immunité antivirale induite par l'activation de RLR (*RIG-I like receptor*). RACK1 inhibe les voies de signalisation induite par RIG-I, MAVS et TBK1 lors d'une infection par le virus Sendai, notamment par dégradation des complexes formés par MAVS et TRAF2, 3 et 6 (Xie *et al.*, 2019). L'inhibition de la signalisation engendre une diminution de l'expression d'IFN- β ainsi que de l'activité transcriptionnelle à partir de promoteurs contenant un ISRE. La stimulation de RIG-I peut induire la phosphorylation et l'activation d'IRF3 par TBK1 (Fitzgerald *et al.*, 2003). En plus d'inhiber l'activation d'IRF3 par TBK1 (Xie *et al.*, 2019), RACK1 recrute la protéine phosphatase 2A (PP2A) afin de déphosphoryler IRF3 et mettre fin à la signalisation, évitant une activation trop prolongée d'IRF3 et de la transcription d'ISG (Long *et al.*, 2014).

6. RACK1 et les infections virales

RACK1 ayant des fonctions cellulaires très diverses, son implication dans l'infection par différents virus a été plusieurs fois décrite, même si les mécanismes précis n'ont pas toujours été élucidés. La liaison de RACK1 au ribosome est nécessaire à la traduction IRES-dépendante du HCV (Majzoub *et al.*, 2014). Le rôle de RACK1 dans la traduction IRES-dépendante a également été décrit pour des virus ayant d'autres types d'IRES tels que le Poliovirus, l'EMCV ou le CrPV chez l'insecte (LaFontaine *et al.*, 2020; Majzoub *et al.*, 2014). La réplication du HCV a lieu dans des DMV issues du RE. Une étude récente a montré que RACK1 permet l'interaction de NS5A avec le facteur d'autophagie ATG14 (*Autophagy related 14*) et que cette interaction est nécessaire à la formation des DMV et à la réplication virale (Lee *et al.*, 2019a).

Le virus de la dengue (DENV) fait partie de la même famille que le HCV mais appartient à un autre genre : les Flavivirus. Contrairement au HCV, les Flavivirus expriment une protéine NS1 notamment impliquée dans les étapes précoces de la réplication virale (Lindenbach & Rice, 1999; Watterson *et al.*, 2016). Une étude de l'interactome de la protéine NS1 du DENV a identifié RACK1 comme un partenaire de NS1 (Hafirassou *et al.*, 2017). La diminution de l'expression de RACK1 par siARN induit une baisse de la réplication du DENV, sans inhiber la

traduction virale. Le même phénotype a été observé lors de l'infection par le virus Zika et le virus du Nil occidental, deux autres membres des Flavivirus.

Lors du bourgeonnement du virus Influenza A (IAV), la protéine de matrice M1 interagit avec RACK1. La mutation du domaine d'interaction de M1 avec RACK1 ou la diminution de l'expression de RACK1 induit une inhibition du bourgeonnement et de la production de particules virales (Demirov *et al.*, 2012). Cependant, le rôle précis de RACK1 dans ce processus n'a pas encore été élucidé.

Récemment, une étude a montré que l'infection par HSV-1 induit l'expression de RACK1 selon un mécanisme inconnu (Ullah *et al.*, 2019). La protéine RACK1A d'*A. thaliana* possède un site de phosphorylation en Tyr248 qui permet des homo- et des hétéro-dimérisations de RACK1, importantes notamment lors de stress. Ce site pouvant être intéressant dans le développement de traitements ciblant les protéines de l'hôte, un criblage *in silico* de la structure de RACK1A d'*A. thaliana* et une validation fonctionnelle ont été réalisés et ont permis d'identifier 2 molécules capables de se lier au site de phosphorylation Tyr248 de RACK1A et d'empêcher la phosphorylation. Les auteurs ont ensuite étudié l'effet de ces molécules sur la réplication du HSV-1 et ont observé que l'une des deux molécules, SD29-14, est capable d'inhiber *in vitro* la réplication de HSV-1 de manière aussi efficace que l'acyclovir (Ullah *et al.*, 2019). Le rôle de RACK1 dans l'infection par HSV-1 et le mécanisme par lequel la molécule SD29-14 inhibe la réplication du HSV-1 restent cependant inconnus.

Introduction

Partie II : Les virus de l'hépatite B et D et l'étude des interactions virus-hôte par criblage haut-débit

Review

Targeting the Host for New Therapeutic Perspectives in Hepatitis D

Vincent Turon-Lagot ¹, Antonio Saviano ^{1,2}, Catherine Schuster ¹, Thomas F. Baumert ^{1,2} and Eloi R. Verrier ^{1,*}

¹ Université de Strasbourg, Inserm, Institut de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques UMR_S1110, F-67000 Strasbourg, France

² Institut Hospitalo-Universitaire, Pôle Hépat-Digestif, Nouvel Hôpital Civil, F-67000 Strasbourg, France

* Correspondence: e.verrier@unistra.fr; Tel.: +33-3-68-85-37-06; Fax: +33-3-68-85-37-24

Received: 29 October 2019; Accepted: 10 January 2020; Published: 14 January 2020

Abstract: Hepatitis D virus (HDV) is a small satellite virus of hepatitis B virus (HBV) requiring HBV infection to complete its life cycle. It has been recently estimated that 13% of chronic HBV infected patients (60 million) are co-infected with HDV. Chronic hepatitis D is the most severe form of viral hepatitis with the highest risk to develop cirrhosis and liver cancer. Current treatment is based on pegylated-interferon-alpha which rarely controls HDV infection and is complicated by serious side effects. The development of novel antiviral strategies based on host targeting agents has shown promising results in phase I/II clinical trials. This review summarizes HDV molecular virology and physiopathology as well as new therapeutic approaches targeting HDV host factors.

Keywords: Hepatitis D; antiviral strategy; host factors; liver disease

1. Introduction

Chronic hepatitis D is the most severe form of chronic viral hepatitis. It is caused by hepatitis D/delta virus (HDV), the smallest virus infecting mammals [1], which was first described in 1977 as a new hepatitis B virus (HBV)- associated antigen [2]. HDV is a small circular positive single stranded RNA virus, satellite of HBV relying on HBV surface protein HBsAg expression to produce new infectious particles [1,3,4]. HDV co- or super-infection in HBV chronically infected patients accelerates and worsens the progression of liver disease and triples the risk of developing hepatocellular carcinoma (HCC) [5,6]. HDV infection has been largely underestimated for the past decades. It was previously estimated that around 5% of chronic hepatitis B (CHB) patients were co-infected with HDV [7]. Recently, two different meta-analysis studies reevaluated this estimation at 13–14% of CHB patients, corresponding to 50–60 M people worldwide [7,8]. This prevalence corresponds to 0.8% of the general population. The previous underestimation can be explained by: (i) the absence of systematic screening of HDV in HBsAg positive patients; (ii) the recent improvement of HDV detection tools, leading to an increase in the number of diagnosed patients [9,10]. HDV infected patients are not equally distributed around the globe. Some regions are more affected by HDV infections, such as the Mediterranean basin, North and Central Africa, Russia and South-East Asia [7]. Some countries exhibit particularly high HDV prevalence such as Tunisia (15.33%), Mongolia (8.31%) and Nigeria (5.04%) [8].

Despite a very efficient HBV vaccine protecting against HDV infection, HBV and HDV infections are still on the rise worldwide. Current pegylated (PEG)-interferon (IFN)-alpha based therapy clears HDV infection in only 30% of the patients [11–13] and there is currently no other treatment that effectively controls HDV infection. Nevertheless, new therapeutic approaches are under preclinical and clinical development with some of them showing promising results.

2. HDV Life Cycle

HDV is characterized by a positive single-stranded circular RNA genome of around 1700 nucleotides size [14]. Interestingly, HDV RNA genome is predicted to have around 74% of paired bases giving it a rod-like structure [15]. It encodes only one protein, the delta antigen HDAg, expressed in two forms: the small form (S-HDAg) and the large form (L-HDAg) [1,16]. Both forms of HDAg have no enzymatic function and are associated with the HDV genome forming a ribonucleoprotein (RNP). During the life cycle, RNP is enveloped by HBV surface antigens (HBsAg) (Figure 1) [3,17]. Therefore, HDV complete life cycle depends on HBV infection and the expression of HBV envelop proteins. Importantly, HBV infection seems to be critical only for HDV particles assembly and egress but is not involved in other steps of HDV life cycle. Indeed, *in vitro* culture systems allow HDV replication and particle production in cells expressing only HDV genome and HBsAg without HBV replication [18,19]. This explains why antiviral nucleot(s)ide treatments, highly effective in controlling HBV replication, have no effect on HDV infection and pathogenesis [20].

HDV tropism is restricted to hepatocytes, most likely due to HBsAg specific interaction with NTCP (sodium taurocholate co-transporting polypeptide), the receptor for HBV/HDV at the surface of hepatocytes [21,22]. HDV virions attach to heparan sulfate proteoglycans (HSPG), including GPC5, on the surface of the hepatocyte [23–25] and then specifically bind its receptor NTCP (Figure 2) [21,26]. HDV is then internalized through endocytosis and the viral RNP is released in the cytoplasm. Both forms of HDAg contain a nuclear localization signal (NLS) that addresses the viral RNP to the nucleus [27,28]. As the viral genome encodes only one structural protein, HDV replication fully relies on host polymerases. In the nucleus, RNA polymerase II usually employs DNA as a transcription template. However, HDV RNA seems to be recognized by RNA polymerase II, probably through its rod-like structure and interaction with S-HDAg and other cellular proteins, to be used as a template for HDAg mRNA transcription [29]. Newly synthesized S-HDAg then promotes viral replication that starts with the viral genome being transcribed by cellular RNA polymerase II to form viral anti-genomes of negative polarity through a rolling circle mechanism (Figure 3) [30,31]. However, former studies found that HDV anti-genome is synthesized by RNA polymerase I [29,32] and that HDAg mRNA is transcribed in the nucleoplasm and HDV anti-genome is synthesized in nucleoli [33,34]. Linear polymers of HDV anti-genomes are produced and self-cleaved through the ribozyme activity of the anti-genome. Single copies of anti-genome are then circularized. The newly synthesized anti-genome serves as a template for the production of *de novo* HDV genome copies by RNA polymerase II, through a similar rolling-circle mechanism (Figure 3) [31,32]. Recently, a genetic screen uncovered CAD, a protein involved in the first steps of uridine synthesis, as a key host factor for HDV replication affecting genomic and anti-genomic forms of viral RNAs [35]. Viral anti-genome can be edited by the cellular protein ADAR1, which induces an adenosine to inosine transformation in HDAg stop codon (Figure 2) [36,37]. This will further lead to the transcription of edited HDAg mRNA that will be translated into the large form of HDAg. In the cytoplasm, L-HDAg is farnesylated by a cellular protein [38,39] and the modified HDAg is translocated in the nucleus, promoting viral morphogenesis by inhibiting viral replication [40]. Newly synthesized HDV genomes associate with both forms of HDAg to form new viral RNPs that are exported from the nucleus via the TAP/Aly pathway [41] through the nuclear export signal (NES) located in the C-terminal part of L-HDAg [42]. In the cytoplasm, the viral RNP is recruited to the endoplasmic reticulum following interaction between the farnesylated L-HDAg and the cytosolic part of HBsAg [43]. This interaction induces HDV RNP envelopment and secretion from the infected cell through unknown mechanisms.

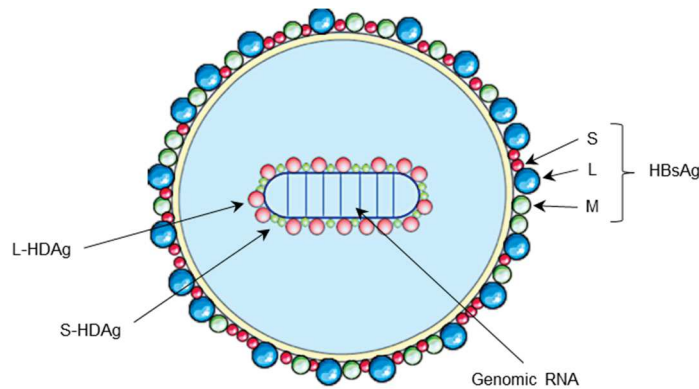


Figure 1. Hepatitis D virus (HDV) structure. (A) Schematic representation of HDV viral particle. HDV virion contains an envelope derived from the endoplasmic reticulum, in which are embedded the three forms (S, M and L) of hepatitis B virus (HBV) envelope protein, HBs antigen (HBsAg). HDV genome is a circular single stranded RNA of negative polarity associated to the two forms of delta antigen (L-HDAg and S-HDAg) forming a ribonucleoprotein complex.

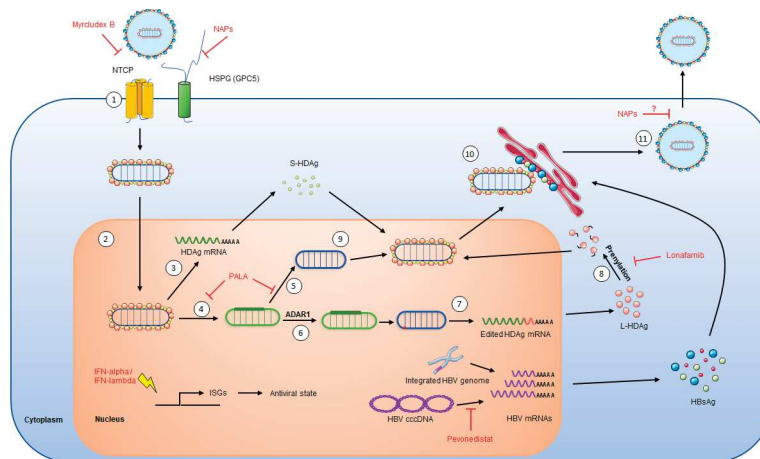


Figure 2. HDV life cycle. (1) HDV life cycle starts with HDV virions attachment to heparan sulfate proteoglycans (HSPG), including Glypican 5 (GPC5), at the hepatocyte surface. L-HBsAg pre-S1 region then binds to HBV/HDV specific receptor, the bile acid transporter NTCP. Viral particle enters the cell through endocytosis and viral RNP is freed in the cytoplasm. (2) Both forms of HDag contain a nuclear localization signal that induces viral RNP translocation to the nucleus. (3) In the nucleus, HDag mRNA transcription is done by RNA polymerase II. HDag mRNA is then exported in the cytoplasm where it is translated to produce the small form of HDag (S-HDAg). (4) During the first step of replication, HDV genomic RNA serves as a template for antigenomic RNA production, probably done by RNA polymerase I. (5) Antigenomic RNA is recognized by RNA polymerase II to produce new genomic RNAs. (6) Antigenomic RNA is edited by ADAR1 enzyme, suppressing S-HDAg stop codon. (7) Edited antigenomic RNA is replicated into genomic RNA, then inducing the transcription of edited HDag mRNA that is exported in the cytoplasm where it leads to the production of the large form of HDag (L-HDAg). (8) L-HDAg contains a prenylation site that is farnesylated by a cellular farnesyltransferase before being translocated to the nucleus. (9) Both forms of HDag interact with newly synthesized genomic RNA to form new viral ribonucleoproteins (RNP) that are exported to the cytoplasm. (10) Viral RNPs interact, through their farnesylated cysteine in L-HDAg, with the cytosolic part of HBsAg at the endoplasmic reticulum surface, thus inducing their envelopment. (11) HDV virions are then secreted from the infected cell. The different steps targeted by antiviral treatments are indicated. Represented cell is also infected by HBV, indicated by its cccDNA or its integrated genome, but its life cycle is not depicted.

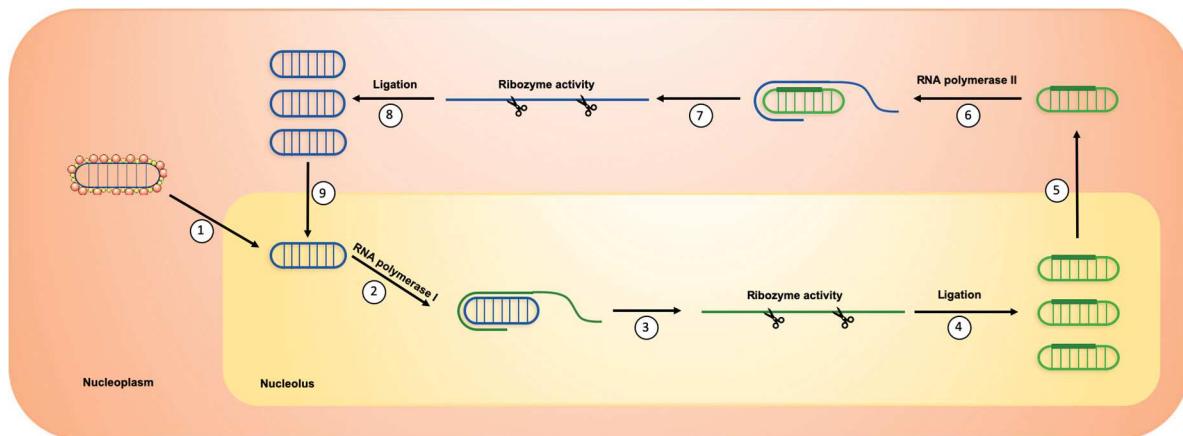


Figure 3. HDV replication. (1) HDV genome is translocated in the nucleolus. (2) It is then recognized by RNA polymerase I to produce concatemers of linear antigenomic RNAs through a rolling circle mechanism. (3) Ribozyme activity induced the cleavage of antigenomic RNA concatemers in antigenomic RNA monomers. (4) Linear antigenomic RNAs are circularized through an unknown ligation process. (5) Antigenomic RNAs are translocated in the nucleoplasm. (6) They are then recognized by RNA polymerase II to produce concatemers of linear genomic RNAs through a rolling circle mechanism. (7) Ribozyme activity induces the cleavage of genomic RNA concatemers into linear genomic RNA monomers. (8) Linear genomic RNAs are then circularized through an unknown ligation process. (9) Newly synthesized HDV genomic RNAs can be translocated again in the nucleolus for a new round of replication.

3. Physiopathology

HDV can infect the liver by two different ways: in co-infection with HBV or in super-infection in chronic HBV (CHB) patients [44]. Whether HDV infection occurs in a co-infection or super-infection, the risk of fulminant hepatitis is increased compared to other viral hepatitis [45,46]. During co-infection, HDV is cleared by the immune system in 95% of adult patients such as HBV mono-infection (Figure 4) [44]. The ability of the immune system to efficiently eliminate HDV leads to a greater risk of fulminant hepatitis and liver failure [47,48]. In patients with a CHB, HDV super-infection is responsible for acute hepatitis [49] and induces general symptoms (e.g., fatigue, anorexia or nausea), elevation of hepatic inflammation markers such as serum ALT [50] and deterioration of liver function with risk of liver decompensation [49]. HDV super-infection leads to a chronic infection in 80% of CHB patients [44]. Chronic hepatitis D (CHD) patients present a threefold higher risk to develop cirrhosis [45] and HCC [6] than CHB patients. An Italian retrospective study followed 299 HDV infected patients for 28 years. During this period, 46 patients developed HCC, representing an annual rate of 2.8% [51]. Interestingly, HDV infection usually leads to a decrease in HBV replication, even though this effect may temporally vary [52,53]. However, when HBV is replicating, HBV-DNA load correlates with inflammatory activity and liver disease severity [54].

HBV is a stealth virus as it does not induce a strong innate immune response in vitro and in infected mice [55,56]. In the same way, HBV/HDV co-infection does not induce significant transcriptional modulations in primary hepatocyte cultures [57] even though HDV infection activates IFN-beta and IFN-gamma expression and induces a strong innate immune response in a cell culture model [58] and in a humanized mouse model [59]. The production of these antiviral and inflammatory cytokines has no effect on HDV replication but induces liver damage as a side effect in the attempt of clearing the virus. In vitro, HDAG repress the activity of two HBV promoters and L-HDAG activates *MX1* an interferon-induced antiviral protein [60]. The innate immunity activation in HDV infected hepatocytes and the partial inhibition of HBV transcription by HDAG could explain (i) how HDV directly and indirectly dampens HBV replication and (ii) how HBV/HDV co-infection accelerates and worsens liver disease compared to HBV mono-infection.

In addition to HBV, HDV may interfere with another hepatotropic virus, hepatitis C virus, in patients co-infected with those three viruses. In Mongolia, a study on patients having either chronic

hepatitis, liver cirrhosis or HCC showed that 30% of them were co-infected with the three viruses [61]. The molecular perturbations and pathogenesis outcomes seem unclear. Some studies report that HDV becomes the dominant virus and suppresses HBV and HCV replication [62]. Chronic patients with triple infection show a higher progression to cirrhosis and a higher risk to develop HCC compared to HBV/HDV patients. Moreover, during acute phase of super infection there is an increased risk of fulminant hepatitis. It was recently shown in vitro that HDV viral particles could be enveloped by HCV glycoproteins instead of HBsAg. It would be interesting to see in those patients if there are HDV/HCV co-infected hepatocytes and if infectious HDV/HCV particles are produced [63]. This could also give hints if HDV perturbations of HCV replication are mediated by a direct or an indirect mechanism.

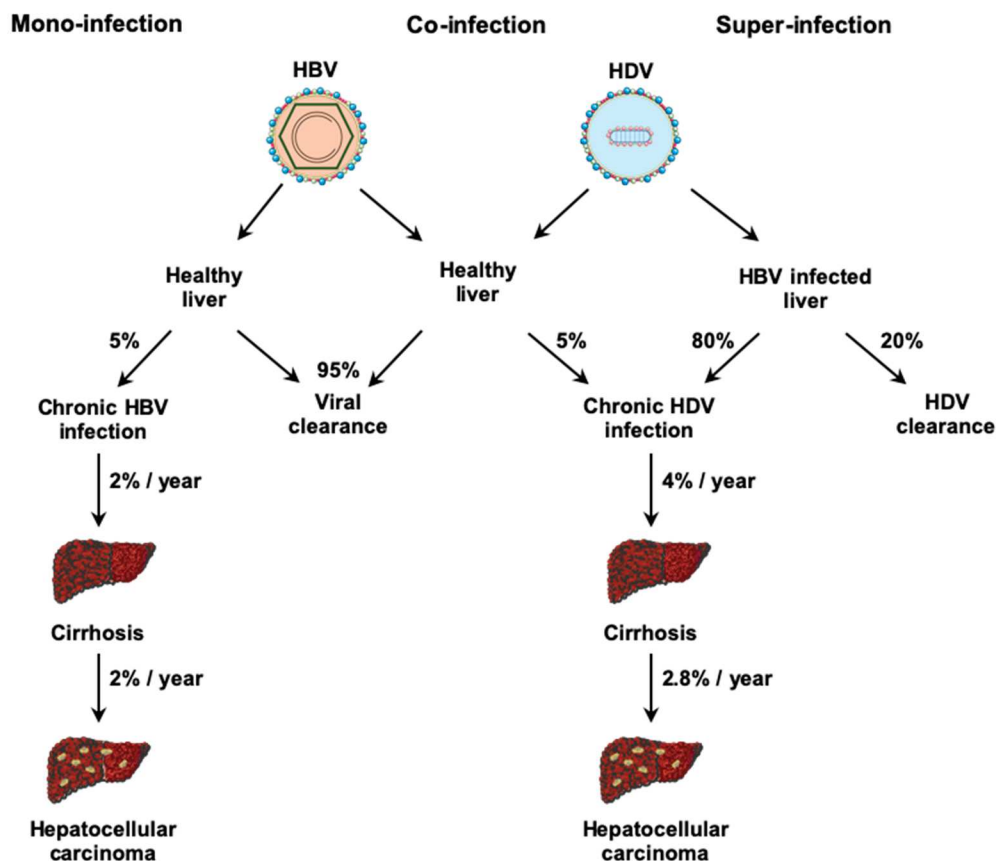


Figure 4. Natural history of HBV mono-infection and HDV co- and super-infection.

4. Therapeutics: Past and Future

4.1. Current Treatment: Pegylated Interferon Alpha

The only treatment currently available for the clinical practice is PEG-IFN-alpha. Only 30% of HDV patients respond to PEG-IFN-alpha and rarely achieve viral clearance [11–13]. Furthermore, PEG-IFN-alpha is responsible for many serious side effects including flu-like symptoms, nausea, insomnia and depression, frequently leading to treatment discontinuation [64–66]. The other challenge is that, to be successful, a treatment must inhibit both HDV replication and HBsAg production, since the inhibition of HDV replication alone is often followed by a relapse in HDV replication after the end of treatment. Unfortunately, nucleot(s)ides analogs treatment used against HBV infection are ineffective against HDV replication because they do not reduce HBsAg production [20]. The lack of viral proteins expressed by HDV strongly limits the development of direct-acting antivirals. The only HDV enzymatic activity relies on the ribozyme. However, ribozyme inhibitors

exhibited a marked toxicity *in vitro* and have therefore not been extensively studied for HDV treatment [67].

In this context, host targeting agents (HTAs) represent attractive therapeutic strategies, by targeting host proteins whose function is required for virus infection. Some of these drugs are already used in other chronic viral infections, such as Maraviroc, an antagonist of CCR5 that inhibits HIV entry [68]. HTAs reduce the risk of viral resistance to treatment, especially against RNA viruses that are known to mutate and adapt rapidly [69,70]. Since HDV largely relies on host proteins to fulfill each step from entry to viral particles secretion, the identification of these host factors would provide new cellular targets for viral cure. Even though the molecular interactions between HDV and hepatocyte host factors are still largely unknown, several HTAs are currently tested in clinical trials.

4.2. New Therapeutic Agents in Clinical Trials

4.2.1. Interferon-Lambda, A Better Tolerated Immunomodulator

Interferon-lambda (IFN-lambda) is the type III interferon and, upon binding to its receptor, induces a signaling cascade similar to the one induced by IFN-alpha [71]. Contrary to IFN-alpha receptor, IFN-lambda receptor is not ubiquitously expressed therefore leading to limited side effects. A recent study called LIMT (for Lambda Interferon MonoTherapy) HDV investigated the safety and efficacy of pegylated IFN-lambda (PEG-IFN-lambda) monotherapy in chronic HDV infected patients from Pakistan, Israel and New-Zealand [72]. In this trial, 33 HDV patients receiving an anti-HBV nucleos(t)ide analog were treated with either PEG-IFN-lambda 180 µg ($n = 14$) or 120 µg ($n = 19$) by weekly subcutaneous injections for 48 weeks. After treatment, the patients were followed up for 24 weeks and 7 out of 14 patients (50%) from the 180 µg group exhibited at least a 2-log decline in HDV RNA and 5 (36%) of them were below the quantification limit. Side effects reported are flu-like symptoms and elevated transaminase levels. However, these side effects appear to be milder than the side effects caused by PEG-IFN-alpha. In the Pakistani cohort, some cases of jaundice and bilirubin elevation were reported. Overall, PEG-IFN-lambda showed better results and less side effects than treatment with PEG-IFN-alpha. Even though the decrease in HDV RNA induced in monotherapy is observed in only 50% of patients, PEG-IFN-lambda seems to be a good alternative to IFN-alpha treatment.

4.2.2. Myrcludex B, an Entry Inhibitor

HBV and HDV share the same envelop and thus the same entry pathway in hepatocytes, involving the binding to the NTCP receptor (Figure 2) [22]. NTCP interacts with the N-terminal region of HBsAg preS1 domain. Even before the identification of NTCP as HBV/HDV receptor, it was already known that myristoylated peptides derived from the 78 aa of the preS1 domain inhibits HBV infection *in vitro* and *in vivo* [73,74]. Following discovery of NTCP as the HBV/HDV receptor, it has been confirmed that synthetic preS1 derived peptides specifically bind to NTCP therefore inhibiting HBV entry into hepatocytes [21,75]. One of these peptides containing 47 aa is now commercialized with the name Myrcludex B (MyrB) or Bulevirtide [76] and has been extensively tested in clinical trials.

The final results from the first phase II clinical trial involving MyrB treatment in combination with tenofovir (TDF) were recently released [77]. In this trial 120 chronic HDV patients were split in four groups. Three groups were treated for 24 weeks with TDF 245 mg/day and different doses of MyrB: 2 (A), 5 (B) or 10 (C) mg administered daily by subcutaneous injection. The last group (D) received TDF 245 mg/day alone for 24 weeks. After this period, all groups received an additional TDF treatment for 24 weeks. At the end of treatment, primary endpoint was reached for 46.4% (A), 46.8% (B), 76.6% (C) and 3.3% (D) of patients. Alas, at 12 weeks follow up, HDV relapse was observed in 60% (A), 80% (B) and 83% (C) of responder patients even though HDV RNA median was still lower than baseline. Giving the high number of HDV relapse, a phase II clinical trial assessing the efficacy of MyrB in combination with PEG-IFN-alpha was performed [78]. Sixty patients were split in four groups and were treated for 48 weeks with either: (A) 180 µg PEG-IFN-alpha, (B) 2 mg MyrB + 180

µg PEG-IFN-alpha, (C) 5 mg MyrB + 180 µg PEG-IFN-alpha or (D) 2 mg MyrB (Table 1). MyrB was administered once daily and PEG-IFN-alpha once a week, both by subcutaneous injections. Briefly, monotherapy with either PEG-IFN-alpha (A) or 2 mg MyrB (D) exhibited a poor response to treatment with only two patients out of 15 (13%) in each group having undetectable HDV RNA at the end of the treatment (EOT). All of them relapsed within the follow-up period. In group B, 9/15 (60%) of patients exhibited undetectable HDV RNA at EOT and only one relapse in 24 weeks after EOT (Table 1). Furthermore, this group is the only one that had a decrease in HBsAg production with 6/15 (40%) of patients having at least 1 log decrease in HBsAg compared to baseline at the end of the follow-up period. MyrB frequently induces bile acid increase that can lead to mild/moderate side effects but the safety in cirrhotic patients has to be demonstrated.

Overall, this treatment does not seem really suitable for monotherapy since it does not inhibit HBsAg production by itself [79]. Combination treatments seem to be more effective at inhibiting both HDV replication and HBsAg production [77,78]. It is to note that in France, Bulevirtide (commercial name of MyrB) recently got an exceptional temporary authorization of use in patients having cirrhosis or severe fibrosis [80], showing the growing interest in this treatment.

4.2.3. Lonafarnib, a Morphogenesis Inhibitor

During the HDV life cycle, the C-terminal domain of L-HDAg is farnesylated by a cellular farnesyltransferase (Figure 2). This post-translational modification is required for L-HDAg interaction with HBsAg at the endoplasmic reticulum, thus inducing virions envelopment [43]. Lonafarnib is a farnesyltransferase inhibitor that was first investigated as a treatment for Hutchinson–Gilford progeria syndrome [81]. Lonafarnib (LNF) has been investigated in combination with ritonavir (RTV) through four different phase II studies called LOWR-HDV [82–85]. RTV does not have an antiviral effect but is an inhibitor of LNF metabolism and thus increases its availability, stability and efficacy at lower doses [83]. LOWR-HDV-4 was a dose escalation study and enrolled 15 patients. All patients first started with 50 mg LNF and 100 mg RTV administered twice a day. After four weeks, if the treatment was well tolerated LNF dose was increased to 75 mg and after two more weeks it was increased to 100 mg. Overall, patients were treated for 24 weeks followed by 24 weeks post-treatment follow-up [85]. Highest LNF dose could be administered to 10/15 patients (66%) but only five remained at this dose until end of treatment. At EOT, only one patient became PCR-negative and one had HDV RNA below limit of detection. The latter remained below limit of detection at eight weeks follow up.

Recently, another phase IIa study released interim results [86]. In this study called LIFT, 26 patients were treated with 50 mg LNF and 100 mg RTV twice daily and weekly subcutaneous injection of 180 mcg pegylated-interferon-lambda-1a (LMB) for 24 weeks (Table 1). Data at 24 weeks of treatment were available only for 19 patients. Treatment dose was reduced in three patients and four patients discontinued treatment. At EOT, 18/19 patients (95%) exhibited a greater than 2 log HDV RNA decrease and 10/19 (53%) showed undetectable HDV RNA level. These preliminary results suggest a greater efficacy of combination treatment, with mild to moderate side effects.

Finally, LNF will be studied in a phase III clinical trial called D-LIVR (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03719313) that started in December 2018. In this clinical trial, patients will be treated for 48 weeks with 50 mg LNF and 100 mg RTV with or without weekly injection of 180 mg PEG-IFN-alpha-2a. The estimated completion date for this clinical trial is April 2021.

4.2.4. Nucleic Acid Polymers, Inhibitor of HBsAg Secretion

Nucleic acid polymers (NAPs) are phosphothiorated oligonucleotides having a great in vivo denaturation and degradation resistance. Previous data reveal a broad-spectrum antiviral activity including inhibition of hepatitis C virus entry [87] and infection by several herpesviruses' infection [88]. Different NAPs exhibit an antiviral activity against HDV even though their mechanism of action is not fully understood. It is supposed that NAPs could act at different levels against HDV infection, inhibiting viral entry [89] or HBsAg secretion [90]. Interestingly, their antiviral activity does not seem to rely on their sequence but rather depends on their size and hydrophobicity [90]. First, two different

NAPs, called REP2055 and REP2139, were studied in chronic hepatitis B patients [91]. Both compounds showed a strong antiviral activity, sometimes accompanied with seroconversion. REP2139 being more tolerated than REP2055, it has been chosen for further clinical trials. REP2139 safety and efficacy against HBV and HDV in co-infected patients was assessed in the REP-301 clinical trial. In this trial, 12 patients were treated weekly by intravenous injection of 500 mg REP2139 for 15 weeks, then with 250 mg REP2139 combined with subcutaneous injection of 180 µg PEG-IFN-alpha-2a for 15 weeks, followed by a final treatment of weekly subcutaneous injection of 180 µg PEG-IFN-alpha-2a for 33 weeks (Table 1). All the 12 patients experienced side effects including neutropenia (67%), thrombocytopenia (83%) or increased alanine aminotransferase (ALT) levels (42%). Furthermore, four patients (33%) had serious side effects including elevated alanine and aspartate aminotransferase concentrations and strong thrombocytopenia, however all of them were attributed to PEG-IFN-alpha-2a treatment [92]. During treatment, 11 patients (92%) became HDV RNA negative and nine of them (75%) remained negative at the end of treatment. Recently, results from a long-term follow-up of 2.5–3 years reported that the nine patients that previously were HDV RNA negative still had more than 2 log HDV RNA reduction from baseline and seven of them (58%) were still HDV RNA negative (Table 1) [93]. Regarding those seven patients, all of them had asymptomatic transaminase flare while having HBsAg concentration lower than 1 IU/mL during therapy and 4 of them (57%) had a functional HBV cure with HBsAg below the limit of detection, undetectable HBV DNA and normal ALT.

Functional studies showed that antiviral effect of REP2139 can be active through two different mechanisms of action. First, it inhibits HBsAg secretion, thus inhibiting HBV and HDV viral particle envelopment and secretion. It can also interact with both forms of HDAG, interaction with S-HDAG could inhibit HDV replication and interaction with L-HDAG could inhibit HDV RNP assembly (Figure 2) [94]. Overall, REP2139 showed a great antiviral activity against both HBV and HDV, but these results need to be confirmed on larger cohorts of patients.

Table 1. Antiviral molecules in clinical trial. MyrB: myrcludex B; PEG-IFNA: pegylated-interferon-alpha-2a; LNF: lonafarnib; RTV: ritonavir; LMB: pegylated-interferon-lambda; CT: clinical trial; LLOQ: lower limit of quantification; EOT: end of treatment; FU: follow-up; SSE: serious side effect; ND: no data.

	Cellular Target/ Step of HDV Life Cycle	Current Clinical Trial Step	Posology	EOT	FU (24w)	Drawbacks	References
MyrB+ PEG-IFNA	NTCP / Entry inhibitor	Phase III	Phase II CT: 2 or 5 mg MyrB daily + 180 µg IFNA weekly (48 weeks)	LLOQ: 15/30 (50%)	LLOQ: 12/30 (40%)	3 relapses at FU (24 weeks); SSE: 5	[78]
LNF + RTV + LMB	Farnesylation / Assembly inhibitor	Phase III	Phase II CT: 50 mg LNF + 100 mg RTV twice a day 180 mcg LMB weekly	>2log decrease: 18/19 (95%) LLOQ: 10/19 (53%)	ND	ALT flares at EOT	[86]
REP2139	? / HBsAg secretion inhibitor	Phase II	500 mg weekly (15 weeks), 250 mg + 180 µg IFNA (15 weeks), 180 µg IFNA (33 weeks)	>2log decrease: 9/11 (82%) LLOQ: 9/11 (82%)	>2log decrease: 9/11 (82%) LLOQ: 7/11 (63%)	SSE in 4/11 patients (33%)	[92,93]
PALA	CAD / HDV replication	Preclinical study	100 µM in cultured PHH without toxicity	ND	ND	Safety in an animal model not assessed yet	[35]
Pevonedistat	NAE1 / HBV transcription	Preclinical study	1 µM in cultured PHH without toxicity	ND	ND	Mild to strong SE observed in phase Ib CT	[95,96]

4.3. In Vitro Studies

4.3.1. PALA, Inhibitor of HDV Replication

This year, a genetic screen identified pyrimidine metabolism pathway as important for HDV replication [35]. Specifically, in vitro experiments showed that silencing or knock-out of CAD, an enzyme involved in the first three steps of uridine biosynthesis, induced a strong decrease in HDV replication. Sparfocic acid or PALA (N-(phosphonoacetyl)-L-aspartic acid) is a specific inhibitor of CAD activity [97]. Treatment of HDV infected cells with PALA strongly decreased HDV replication without major toxicity and this effect could be reversed by media complementation with uridine showing the specificity of action of PALA (Figure 2) [35]. Furthermore, PALA treatment has no effect on HBV replication. It is to note that PALA was already investigated in a phase II clinical trial for patients with advanced gastric carcinoma and that no major toxicity was observed [98]. Therefore, PALA could be used in combination therapy in co-infected patients.

4.3.2. Pevonedistat, Inhibitor of HBV Transcription

In addition to the inhibition of the HDV life cycle per se, HBsAg production has to be targeted to avoid HDV relapse after treatment [99]. In this context, one strategy consists in a combination treatment including anti-HDV agents and inhibitors of HBV transcription. Neddylation is an ubiquitylation-like process inducing neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated protein 8 (NEDD-8) combination with a specific substrate usually inducing activation or increasing stability [100]. The first discovered neddylation substrates are Cullin proteins. Their neddylation induces specific ubiquitylation and proteasomal degradation of protein substrates. It was recently shown that HBV regulatory protein X (HBx) uses this neddylation process to target the structural maintenance of chromosomes 5/6 (Smc5/6) protein and induce its ubiquitylation and degradation, therefore enhancing HBV transcription from cccDNA [101,102]. Pevonedistat (or MLN4924) is a specific inhibitor of NEDD8 Activating Enzyme E1 Subunit 1 (NAE1), the first protein involved in NEDD8 catalyze [100] and has recently been studied in a phase Ib clinical trial in patients with solid tumors [95]. A recent in vitro study showed that pevonedistat treatment in HBV-infected cells or PHH could effectively restore Smc5/6 protein level, thus inducing HBV transcription inhibition (Figure 2) [96]. The effect on HBV transcription was induced at micromolar concentration without any observed toxicity. Pevonedistat inducing an inhibition of HBsAg production, it could be used in combination with HDV replication inhibitors. The combination could indeed induce a real elimination of HDV infected cells and clearance of the virus.

5. Conclusion

HDV is a very peculiar virus responsible for the most severe form of viral hepatitis. There is, to date, no treatment able to cure HDV infection, thus representing a major health issue. However, two treatments, i.e., MyrB and LNF, have completed phase II clinical studies and LNF already started a phase III clinical study. Bulevirtide (MyrB) recently got an exceptional temporary authorization of use in France for patients having cirrhosis or severe fibrosis [80]. Overall, the new compounds for the treatment of HDV show higher effects when combined with PEG-IFN and when a strong reduction or clearance of HBsAg is obtained. The complexity of the HDV/HBV infection and the virus-host interactions should be considered in the therapeutic approach of this disease. PEG-IFN-alpha treatment is still a mainstay and combination therapies targeting also HBV have the highest chance to success.

More virus-host interactions studies will certainly lead to the discovery of new HDV host factors and therapeutics. Therefore, effort must be maintained in this field. HDV infection is still underdiagnosed even though diagnostic tools are becoming faster and cheaper. More efforts should be put to fill this gap, vaccinate for HBV and screen for HDV infection all the HBV infected patients. There is no use of developing antiviral molecules if patients are not aware of their status and cannot

be treated. Improvements in all these directions will hopefully lead to the eradication of this major hepatic virus.

Author Contributions: V.T.L., A.S., C.S., T.F.B. and E.V. wrote the manuscript.

Funding: This research was funded by the Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les hépatites virales (ANRS) grant number ECTZ104527.

Acknowledgments: This work was supported by Inserm and the University of Strasbourg. This work has been published under the framework of the LabEx HepSYS (ANR-10-LAB-28). Vincent Turon-Lagot was supported by a teaching assistant (ATER) contract from French Ministry of higher education and research. Figures: Some elements of the figures have been reproduced or modified with Servier Medical Art authorization (license: <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/fr/>).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Sureau, C.; Negro, F. The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis. *J. Hepatol.* **2016**, *64*, 102–116.
2. Rizzetto, M.; Canese, M.G.; Aricò, S.; Crivelli, O.; Trepo, C.; Bonino, F.; Verme, G. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut* **1977**, *18*, 997–1003.
3. Rizzetto, M.; Hoyer, B.; Canese, M.G.; Shih, J.W.; Purcell, R.H.; Gerin, J.L. delta Agent: Association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 6124–6128.
4. Sureau, C.; Guerra, B.; Lanford, R.E. Role of the large hepatitis B virus envelope protein in infectivity of the hepatitis delta virion. *J. Virol.* **1993**, *67*, 366–372.
5. Fattovich, G.; Giustina, G.; Schalm, S.W.; Hadziyannis, S.; Sanchez-Tapias, J.; Almasio, P.; Christensen, E.; Krogsgaard, K.; Degos, F.; de Moura, M.C.; et al. Occurrence of hepatocellular carcinoma and decompensation in western European patients with cirrhosis type B. The EUROHEP Study Group on Hepatitis B Virus and Cirrhosis. *Hepatology* **1995**, *21*, 77–82.
6. Fattovich, G.; Giustina, G.; Christensen, E.; Pantalena, M.; Zagni, I.; Realdi, G.; Schalm, S.W. Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. The European Concerted Action on Viral Hepatitis (Eurohep). *Gut* **2000**, *46*, 420–426.
7. Chen, H.Y.; Shen, D.T.; Ji, D.Z.; Han, P.C.; Zhang, W.M.; Ma, J.F.; Chen, W.S.; Goyal, H.; Pan, S.; Xu, H.G. Prevalence and burden of hepatitis D virus infection in the global population: A systematic review and meta-analysis. *Gut* **2018**, *68*, 512–521.
8. Miao, Z.; Zhang, S.; Ou, X.; Li, S.; Ma, Z.; Wang, W.; Peppelenbosch, M.P.; Liu, J.; Pan, Q. Estimating the global prevalence, disease progression and clinical outcome of hepatitis delta virus infection. *J. Infect. Dis.* **2019**, doi:10.1093/infdis/jiz633.
9. Le Gal, F.; Dziri, S.; Gerber, A.; Alloui, C.; Ben Abdesselam, Z.; Roulot, D.; Brichtler, S.; Gordien, E. Performance Characteristics of a New Consensus Commercial Kit for Hepatitis D Virus RNA Viral Load Quantification. *J. Clin. Microbiol.* **2017**, *55*, 431–441.
10. Rocco, C.; Bonavolta, R.; Vallefucio, L.; Braschi, U.; Sorrentino, R.; Terracciano, D.; Portella, G. Comparison of anti-hepatitis D virus (HDV) ETI-AB-DELTA-2 assay and the novel LIAISON® XL MUREX anti-HDV assay in the diagnosis of HDV infection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2019**, *95*, 114873.
11. Niro, G.A.; Ciancio, A.; Gaeta, G.B.; Smedile, A.; Marrone, A.; Olivero, A.; Stanzione, M.; David, E.; Brancaccio, G.; Fontana, R.; et al. Pegylated interferon alpha-2b as monotherapy or in combination with ribavirin in chronic hepatitis delta. *Hepatology* **2006**, *44*, 713–720.
12. Castelnau, C.; Le Gal, F.; Ripault, M.P.; Gordien, E.; Martinot-Peignoux, M.; Boyer, N.; Pham, B.N.; Maylin, S.; Bedossa, P.; Dény, P.; et al. Efficacy of peginterferon alpha-2b in chronic hepatitis delta: Relevance of quantitative RT-PCR for follow-up. *Hepatology* **2006**, *44*, 728–735.
13. Ferenci, P.; Formann, E.; Romeo, R. Successful treatment of chronic hepatitis D with a short course of peginterferon alfa-2a. *Am. J. Gastroenterol.* **2005**, *100*, 1626–1627.
14. Kos, A.; Dijkema, R.; Arnberg, A.C.; van der Meide, P.H.; Schellekens, H. The hepatitis delta (delta) virus possesses a circular RNA. *Nature* **1986**, *323*, 558–560.
15. Chen, P.J.; Kalpana, G.; Goldberg, J.; Mason, W.; Werner, B.; Gerin, J.; Taylor, J. Structure and replication of the genome of the hepatitis delta virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 8774–8778.

16. Wang, K.S.; Choo, Q.L.; Weiner, A.J.; Ou, J.H.; Najarian, R.C.; Thayer, R.M.; Mullenbach, G.T.; Denniston, K.J.; Gerin, J.L.; Houghton, M. Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (delta) viral genome. *Nature* **1986**, *323*, 508–514.
17. Bonino, F.; Heermann, K.H.; Rizzetto, M.; Gerlich, W.H. Hepatitis delta virus: Protein composition of delta antigen and its hepatitis B virus-derived envelope. *J. Virol.* **1986**, *58*, 945–950.
18. Freitas, N.; Cunha, C.; Menne, S.; Gudima, S.O. Envelope proteins derived from naturally integrated hepatitis B virus DNA support assembly and release of infectious hepatitis delta virus particles. *J. Virol.* **2014**, *88*, 5742–5754.
19. Botelho-Souza, L.F.; Vasconcelos, M.P.A.; de Oliveira dos Santos, A.; Salcedo, J.M.V.; Vieira, D.S. Hepatitis delta: Virological and clinical aspects. *Virol. J.* **2017**, *14*, 177.
20. Farci, P.; Chessa, L.; Balestrieri, C.; Serra, G.; Lai, M.E. Treatment of chronic hepatitis D. *J. Viral Hepat.* **2007**, *14*, 58–63.
21. Ni, Y.; Lempp, F.A.; Mehrle, S.; Nkongolo, S.; Kaufman, C.; Fälth, M.; Stindt, J.; Königer, C.; Nassal, M.; Kubitz, R.; et al. Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology* **2014**, *146*, 1070–1083.
22. Verrier, E.R.; Colpitts, C.C.; Sureau, C.; Baumert, T.F. Hepatitis B virus receptors and molecular drug targets. *Hepatol. Int.* **2016**, *10*, 567–573.
23. Verrier, E.R.; Colpitts, C.C.; Bach, C.; Heydmann, L.; Weiss, A.; Renaud, M.; Durand, S.C.; Habersetzer, F.; Durantel, D.; Abou-Jaoudé, G.; et al. A targeted functional RNA interference screen uncovers glypican 5 as an entry factor for hepatitis B and D viruses. *Hepatology* **2016**, *63*, 35–48.
24. Lamas Longarela, O.; Schmidt, T.T.; Schöneweis, K.; Romeo, R.; Wedemeyer, H.; Urban, S.; Schulze, A. Proteoglycans Act as Cellular Hepatitis Delta Virus Attachment Receptors. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e58340.
25. Sureau, C.; Salisse, J. A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus A-determinant. *Hepatology* **2013**, *57*, 985–994.
26. Yan, H.; Zhong, G.; Xu, G.; He, W.; Jing, Z.; Gao, Z.; Huang, Y.; Qi, Y.; Peng, B.; Wang, H.; et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife* **2012**, *1*, e00049.
27. Xia, Y.P.; Yeh, C.T.; Ou, J.H.; Lai, M.M. Characterization of nuclear targeting signal of hepatitis delta antigen: Nuclear transport as a protein complex. *J. Virol.* **1992**, *66*, 914–921.
28. Alves, C.; Freitas, N.; Cunha, C. Characterization of the nuclear localization signal of the hepatitis delta virus antigen. *Virology* **2008**, *370*, 12–21.
29. Modahl, L.E.; Macnaughton, T.B.; Zhu, N.; Johnson, D.L.; Lai, M.M.C. RNA-Dependent Replication and Transcription of Hepatitis Delta Virus RNA Involve Distinct Cellular RNA Polymerases. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 6030–6039.
30. Sheu, G.T. Initiation of hepatitis delta virus (HDV) replication: HDV RNA encoding the large delta antigen cannot replicate. *J. Gen. Virol.* **2002**, *83*, 2507–2513.
31. Chang, J.; Nie, X.; Chang, H.E.; Han, Z.; Taylor, J. Transcription of Hepatitis Delta Virus RNA by RNA Polymerase II. *J. Virol.* **2008**, *82*, 1118–1127.
32. Macnaughton, T.B.; Shi, S.T.; Modahl, L.E.; Lai, M.M.C. Rolling circle replication of hepatitis delta virus RNA is carried out by two different cellular RNA polymerases. *J. Virol.* **2002**, *76*, 3920–3927.
33. Li, Y.J.; Macnaughton, T.; Gao, L.; Lai, M.M.C. RNA-templated replication of hepatitis delta virus: Genomic and antigenomic RNAs associate with different nuclear bodies. *J. Virol.* **2006**, *80*, 6478–6486.
34. Huang, W.H.; Chen, Y.S.; Chen, P.J. Nucleolar targeting of hepatitis delta antigen abolishes its ability to initiate viral antigenomic RNA replication. *J. Virol.* **2008**, *82*, 692–699.
35. Verrier, E.R.; Weiss, A.; Bach, C.; Heydmann, L.; Turon-Lagot, V.; Kopp, A.; El Saghire, H.; Crouchet, E.; Pessaux, P.; Garcia, T.; et al. Combined small molecule and loss-of-function screen uncovers estrogen receptor alpha and CAD as host factors for HDV infection and antiviral targets. *Gut* **2020**, *69*, 158–167.
36. Jayan, G.C.; Casey, J.L. Increased RNA Editing and Inhibition of Hepatitis Delta Virus Replication by High-Level Expression of ADAR1 and ADAR2. *J. Virol.* **2002**, *76*, 3819–3827.
37. Hartwig, D.; Schütte, C.; Warnecke, J.; Dorn, I.; Hennig, H.; Kirchner, H.; Schlenke, P. The large form of ADAR1 is responsible for enhanced hepatitis delta virus RNA editing in interferon-alpha-stimulated host cells. *J. Viral Hepat.* **2006**, *13*, 150–157.
38. Glenn, J.S.; Watson, J.A.; Havel, C.M.; White, J.M. Identification of a prenylation site in delta virus large antigen. *Science* **1992**, *256*, 1331–1333.

39. Otto, J.C.; Casey, P.J. The hepatitis delta virus large antigen is farnesylated both in vitro and in animal cells. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 4569–4572.
40. Hwang, S.B.; Lai, M.M. Isoprenylation masks a conformational epitope and enhances trans-dominant inhibitory function of the large hepatitis delta antigen. *J. Virol.* **1994**, *68*, 2958–2964.
41. Huang, H.C.; Lee, C.P.; Liu, H.K.; Chang, M.F.; Lai, Y.H.; Lee, Y.C.; Huang, C. Cellular Nuclear Export Factors TAP and Aly Are Required for HDag-L-mediated Assembly of Hepatitis Delta Virus. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 26226–26238.
42. Lee, C.H.; Chang, S.C.; Wu, C.H.; Chang, M.F. A novel chromosome region maintenance 1-independent nuclear export signal of the large form of hepatitis delta antigen that is required for the viral assembly. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 8142–8148.
43. Hwang, S.B.; Lai, M.M. Isoprenylation mediates direct protein-protein interactions between hepatitis large delta antigen and hepatitis B virus surface antigen. *J. Virol.* **1993**, *67*, 7659–7662.
44. Negro, F. Hepatitis D virus coinfection and superinfection. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2014**, *4*, a021550.
45. Fattovich, G.; Boscaro, S.; Noventa, F.; Pornaro, E.; Stenico, D.; Alberti, A.; Ruol, A.; Realdi, G. Influence of hepatitis delta virus infection on progression to cirrhosis in chronic hepatitis type B. *J. Infect. Dis.* **1987**, *155*, 931–935.
46. Saracco, G.; Macagno, S.; Rosina, F.; Rizzetto, M. Serologic markers with fulminant hepatitis in persons positive for hepatitis B surface antigen. A worldwide epidemiologic and clinical survey. *Ann. Intern. Med.* **1988**, *108*, 380–383.
47. Smedile, A.; Verme, G.; Cargnel, A.; Dentico, P.; Opolon, P.; Vergani, D.; Farci, P.; Caredda, F.; Caporaso, N.; Trepo, C.; et al. Influence of delta infection on severity of hepatitis B. *Lancet* **1982**, *320*, 945–947.
48. Govindarajan, S.; Chin, K.P.; Redeker, A.G.; Peters, R.L. Fulminant B viral hepatitis: Role of delta agent. *Gastroenterology* **1984**, *86*, 1417–1420.
49. Farci, P.; Niro, G.A. Clinical features of hepatitis D. *Semin. Liver Dis.* **2012**, *32*, 228–236.
50. Bonino, F.; Negro, F.; Baldi, M.; Brunetto, M.R.; Chiaberge, E.; Capalbo, M.; Maran, E.; Lavarini, C.; Rocca, N.; Rocca, G. The natural history of chronic delta hepatitis. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1987**, *234*, 145–152.
51. Romeo, R.; Del Ninno, E.; Rumi, M.; Russo, A.; Sangiovanni, A.; de Franchis, R.; Ronchi, G.; Colombo, M. A 28-Year Study of the Course of Hepatitis Δ Infection: A Risk Factor for Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* **2009**, *136*, 1629–1638.
52. Wu, J.C.; Chen, P.J.; Kuo, M.Y.; Lee, S.D.; Chen, D.S.; Ting, L.P. Production of hepatitis delta virus and suppression of helper hepatitis B virus in a human hepatoma cell line. *J. Virol.* **1991**, *65*, 1099–1104.
53. Schaper, M.; Rodriguez-Frias, F.; Jardi, R.; Taberner, D.; Homs, M.; Ruiz, G.; Quer, J.; Esteban, R.; Buti, M. Quantitative longitudinal evaluations of hepatitis delta virus RNA and hepatitis B virus DNA shows a dynamic, complex replicative profile in chronic hepatitis B and D. *J. Hepatol.* **2010**, *52*, 658–664.
54. Lozano, J.L.; Crespo, J.; de la Cruz, F.; Casafont, F.; Lopez-Arias, M.J.; Martín-Ramos, L.; Pons-Romero, F. Correlation between hepatitis B viremia and the clinical and histological activity of chronic delta hepatitis. *Med. Microbiol. Immunol.* **1994**, *183*, 159–167.
55. Verrier, E.R.; Yim, S.A.; Heydmann, L.; El Saghire, H.; Bach, C.; Turon-Lagot, V.; Mailly, L.; Durand, S.C.; Lucifora, J.; Durantel, D.; et al. Hepatitis B Virus Evasion from Cyclic Guanosine Monophosphate-Adenosine Monophosphate Synthase Sensing in Human Hepatocytes. *Hepatology* **2018**, *68*, 1695–1709.
56. Cheng, X.; Xia, Y.; Serti, E.; Block, P.D.; Chung, M.; Chayama, K.; Rehmann, B.; Liang, T.J. Hepatitis B virus evades innate immunity of hepatocytes but activates cytokine production by macrophages. *Hepatology* **2017**, *66*, 1779–1793.
57. Winer, B.Y.; Gaska, J.M.; Lipkowitz, G.; Bram, Y.; Parekh, A.; Parsons, L.; Leach, R.; Jindal, R.; Cho, C.H.; Shrirao, A.; et al. Analysis of Host Responses to Hepatitis B and Delta Viral Infections in a Micro-scalable Hepatic Co-culture System. *Hepatology* **2019**, 10.1002/hep.30815.
58. Zhang, Z.; Filzmayer, C.; Ni, Y.; Sülthmann, H.; Mutz, P.; Hiet, M.S.; Vondran, F.W.R.; Bartenschlager, R.; Urban, S. Hepatitis D virus replication is sensed by MDA5 and induces IFN- β / λ responses in hepatocytes. *J. Hepatol.* **2018**, *69*, 25–35.
59. Giersch, K.; Allweiss, L.; Volz, T.; Helbig, M.; Bierwolf, J.; Lohse, A.W.; Pollok, J.M.; Petersen, J.; Dandri, M.; Lütgehetmann, M. Hepatitis Delta co-infection in humanized mice leads to pronounced induction of innate immune responses in comparison to HBV mono-infection. *J. Hepatol.* **2015**, *63*, 346–353.

60. Williams, V.; Brichler, S.; Radjef, N.; Lebon, P.; Goffard, A.; Hober, D.; Fagard, R.; Kremsdorf, D.; Dény, P.; Gordien, E. Hepatitis delta virus proteins repress hepatitis B virus enhancers and activate the alpha/beta interferon-inducible MxA gene. *J. Gen. Virol.* **2009**, *90*, 2759–2767.
61. Tsatsralt-Od, B.; Takahashi, M.; Nishizawa, T.; Endo, K.; Inoue, J.; Okamoto, H. High prevalence of dual or triple infection of hepatitis B, C, and delta viruses among patients with chronic liver disease in Mongolia. *J. Med. Virol.* **2005**, *77*, 491–499.
62. Jardi, R.; Rodriguez, F.; Buti, M.; Costa, X.; Cotrina, M.; Galimany, R.; Esteban, R.; Guardia, J. Role of hepatitis B, C, and D viruses in dual and triple infection: Influence of viral genotypes and hepatitis B precore and basal core promoter mutations on viral replicative interference. *Hepatology* **2001**, *34*, 404–410.
63. Perez-Vargas, J.; Amirache, F.; Boson, B.; Mialon, C.; Freitas, N.; Sureau, C.; Fusil, F.; Cosset, F.L. Enveloped viruses distinct from HBV induce dissemination of hepatitis D virus in vivo. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2098.
64. Lempp, F.A.; Ni, Y.; Urban, S. Hepatitis delta virus: Insights into a peculiar pathogen and novel treatment options. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, *13*, 580–589.
65. Wedemeyer, H.; Yurdaydin, C.; Dalekos, G.N.; Erhardt, A.; Çakaloğlu, Y.; Değertekin, H.; Gürel, S.; Zeuzem, S.; Zachou, K.; Bozkaya, H.; et al. Peginterferon plus Adefovir versus Either Drug Alone for Hepatitis Delta. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *364*, 322–331.
66. Yurdaydin, C. New treatment option for delta virus: Is a cure in sight? *J. Viral Hepat.* **2019**, *26*, 618–626.
67. Buchmann, B.; Döhner, K.; Schirdewahn, T.; Sodeik, B.; Manns, M.P.; Wedemeyer, H.; Ciesek, S.; von Hahn, T. A screening assay for the identification of host cell requirements and antiviral targets for hepatitis D virus infection. *Antivir. Res.* **2017**, *141*, 116–123.
68. Woollard, S.M.; Kanmogne, G.D. Maraviroc: A review of its use in HIV infection and beyond. *Drug Des. Dev. Ther.* **2015**, *9*, 5447–5468.
69. Awady, M.K.E.; Dawood, R.M. Resistance to Direct-Acting Antiviral Agents in Treatment of Hepatitis C Virus Infections. In *Update on Hepatitis C*; IntechOpen: London, UK, 2017.
70. Smith, D.; Magri, A.; Bonsall, D.; Ip, C.L.C.; Trebes, A.; Brown, A.; Piazza, P.; Bowden, R.; Nguyen, D.; Ansari, M.A.; et al. Resistance analysis of genotype 3 hepatitis C virus indicates subtypes inherently resistant to nonstructural protein 5A inhibitors. *Hepatology* **2019**, *69*, 1861–1872.
71. Syedbasha, M.; Egli, A. Interferon Lambda: Modulating Immunity in Infectious Diseases. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 119.
72. Etzion, O.; Hamid, S.S.; Lurie, Y.; Gane, E.; Bader, N.; Yardeni, D.; Nevo-Shor, A.; Channa, S.; Mawani, M.; Parkash, O.; et al. PS-052-End of study results from LIMIT HDV study: 36% durable virologic response at 24 weeks post-treatment with pegylated interferon lambda monotherapy in patients with chronic hepatitis delta virus infection. *J. Hepatol.* **2019**, *70*, e32.
73. Gripon, P.; Rumin, S.; Urban, S.; Seyec, J.L.; Glaise, D.; Cannie, I.; Guyomard, C.; Lucas, J.; Trepo, C.; Guguen-Guillouzo, C. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15655–15660.
74. Petersen, J.; Dandri, M.; Mier, W.; Lütgehetmann, M.; Volz, T.; von Weizsäcker, F.; Haberkorn, U.; Fischer, L.; Pollok, J.M.; Erbes, B.; et al. Prevention of hepatitis B virus infection *in vivo* by entry inhibitors derived from the large envelope protein. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 335–341.
75. Lütgehetmann, M.; Mancke, L.V.; Volz, T.; Helbig, M.; Allweiss, L.; Bornscheuer, T.; Pollok, J.M.; Lohse, A.W.; Petersen, J.; Urban, S.; et al. Humanized chimeric uPA mouse model for the study of hepatitis B and D virus interactions and preclinical drug evaluation. *Hepatology* **2012**, *55*, 685–694.
76. Bogomolov, P.; Alexandrov, A.; Voronkova, N.; Macievich, M.; Kokina, K.; Petrachenkova, M.; Lehr, T.; Lempp, F.A.; Wedemeyer, H.; Haag, 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**, *65*, 490–498.
77. Wedemeyer, H.; Bogomolov, P.; Blank, A.; Allweiss, L.; Dandri-Petersen, M.; Bremer, B.; Voronkova, N.; Schöneweis, K.; Pathil, A.; Burhenne, J.; et al. Final results of a multicenter, open-label phase 2b clinical trial to assess safety and efficacy of Myrcludex B in combination with Tenofovir in patients with chronic HBV/HDV co-infection. *J. Hepatol.* **2018**, *68*, S3.
78. Wedemeyer, H.; Schöneweis, K.; Bogomolov, P.O.; Voronkova, N.; Chulanov, V.; Stepanova, T.; Bremer, B.; Allweiss, L.; Dandri, M.; Burhenne, J.; et al. GS-13-Final results of a multicenter, open-label phase 2 clinical trial (MYR203) to assess safety and efficacy of myrcludex B in cwith PEG-interferon Alpha 2a in patients with chronic HBV/HDV co-infection. *J. Hepatol.* **2019**, *70*, e81–e132.

79. Loglio, A.; Ferenci, P.; Uceda Renteria, S.C.; Tham, C.Y.L.; van Bömmel, F.; Borghi, M.; Holzmann, H.; Perbellini, R.; Trombetta, E.; Giovanelli, S.; et al. Excellent safety and effectiveness of high-dose myrcludex-B monotherapy administered for 48 weeks in HDV-related compensated cirrhosis: A case report of 3 patients. *J. Hepatol.* **2019**, *71*, 834–839.
80. ANSM. ATU de Cohorte en Cours—ANSM: Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé. Available online: [https://www.ansm.sante.fr/Activites/Autorisations-temporaires-d-utilisation-ATU/ATU-de-cohorte-en-cours/\(offset\)/4](https://www.ansm.sante.fr/Activites/Autorisations-temporaires-d-utilisation-ATU/ATU-de-cohorte-en-cours/(offset)/4) (accessed on Dec 17, 2019).
81. Berndt, N.; Hamilton, A.D.; Sebti, S.M. Targeting protein prenylation for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 775–791.
82. Yurdaydin, C.; Keskin, O.; Kalkan, Ç.; Karakaya, F.; Çalışkan, A.; Karatayli, E.; Karatayli, S.; Bozdayi, A.M.; Koh, C.; Heller, T.; et al. Optimizing lonafarnib treatment for the management of chronic delta hepatitis: The LOWR HDV-1 study. *Hepatology* **2018**, *67*, 1224–1236.
83. Yurdaydin, C.; Idilman, R.; Keskin, O.; Kalkan, C.; Karakaya, M.F.; Caliskan, A.; Yurdcu, E.; Karatayli, S.C.; Bozdayi, M.; Koh, C.; et al. A phase 2 dose-optimization study of lonafarnib with ritonavir for the treatment of chronic delta hepatitis—End of treatment results from the LOWR HDV-2 study. *J. Hepatol.* **2017**, *66*, S33–S34.
84. Koh, C.; Surana, P.; Han, T.; Fryzek, N.; Kapuria, D.; Etzion, O.; Takyar, V.; Rotman, Y.; Canales, R.; Dahari, H.; et al. A phase 2 study exploring once daily dosing of ritonavir boosted lonafarnib for the treatment of chronic delta hepatitis—End of study results from the LOWR HDV-3 study. *J. Hepatol.* **2017**, *66*, S101–S102.
85. Wedemeyer, H.; Port, K.; Deterding, K.; Wranke, A.; Kirschner, J.; Bruno, B.; Martins, B.; Glenn, J.S.; Kornberg, M.; Manns, M.P. A phase 2 dose-escalation study of lonafarnib plus ritonavir in patients with chronic hepatitis D: Final results from the Lonafarnib with ritonavir in HDV-4 (LOWR HDV-4) study. *J. Hepatol.* **2017**, *66*, S24.
86. Koh, C.; Da, B.L.; Surana, P.; Huang, A.; Kapuria, D.; Rotman, Y.; Vittal, A.; Gilman, C.; Ben-Yakov, G.; Lai, C.; et al. A phase 2 study of lonafarnib, ritonavir and peginterferon lambda for 24 weeks: Interim end-of-treatment results from the LIFT HDV study. *Hepatology* **2019**, *70*, S101–S102.
87. Matsumura, T.; Hu, Z.; Kato, T.; Dreux, M.; Zhang, Y.Y.; Imamura, M.; Hiraga, N.; Juteau, J.M.; Cosset, F.L.; Chayama, K.; et al. Amphipathic DNA polymers inhibit hepatitis C virus infection by blocking viral entry. *Gastroenterology* **2009**, *137*, 673–681.
88. Bernstein, D.I.; Goyette, N.; Cardin, R.; Kern, E.R.; Boivin, G.; Ireland, J.; Juteau, J.M.; Vaillant, A. Amphipathic DNA polymers exhibit antiherpetic activity in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 2727–2733.
89. Beilstein, F.; Blanchet, M.; Vaillant, A.; Sureau, C. Nucleic Acid Polymers Are Active against Hepatitis Delta Virus Infection In Vitro. *J. Virol.* **2018**, *92*, doi:10.1128/JVI.01416-17.
90. Vaillant, A. Nucleic acid polymers: Broad spectrum antiviral activity, antiviral mechanisms and optimization for the treatment of hepatitis B and hepatitis D infection. *Antivir. Res.* **2016**, *133*, 32–40.
91. Al-Mahtab, M.; Bazinet, M.; Vaillant, A. Safety and Efficacy of Nucleic Acid Polymers in Monotherapy and Combined with Immunotherapy in Treatment-Naive Bangladeshi Patients with HBeAg+Chronic Hepatitis B Infection. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0156667.
92. Bazinet, M.; Pântea, V.; Cebotarescu, V.; Cojuhari, L.; Jimbei, P.; Albrecht, J.; Schmid, P.; Le Gal, F.; Gordien, E.; Krawczyk, A.; et al. Safety and efficacy of REP 2139 and pegylated interferon alfa-2a for treatment-naive patients with chronic hepatitis B virus and hepatitis D virus co-infection (REP 301 and REP 301-LTF): A non-randomised, open-label, phase 2 trial. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *2*, 877–889.
93. Bazinet, M.; Pantea, V.; Cebotarescu, V.; Cojuhari, L.; Jimbei, P.; Krawczyk, A.; Dittmer, U.; Vaillant, A. Ongoing analysis of functional control/cure of HBV and HDV infection following REP 2139-CA and pegylated interferon alpha-2a therapy in patients with chronic HBV/HDV co-infection: 3-year follow-up results from the REP 301-LTF study. *Hepatology* **2019**, *70*, 440.
94. Vaillant, A. REP 2139: Antiviral Mechanisms and Applications in Achieving Functional Control of HBV and HDV Infection. *ACS Infect. Dis.* **2019**, *5*, 675–687.
95. Lockhart, A.C.; Bauer, T.M.; Aggarwal, C.; Lee, C.B.; Harvey, R.D.; Cohen, R.B.; Sedarati, F.; Nip, T.K.; Faessel, H.; Dash, A.B.; et al. Phase Ib study of pevonedistat, a NEDD8-activating enzyme inhibitor, in combination with docetaxel, carboplatin and paclitaxel, or gemcitabine, in patients with advanced solid tumors. *Investig. New Drugs* **2019**, *37*, 87–97.

96. Sekiba, K.; Otsuka, M.; Ohno, M.; Yamagami, M.; Kishikawa, T.; Seimiya, T.; Suzuki, T.; Tanaka, E.; Ishibashi, R.; Funato, K.; et al. Pevonedistat, a Neuronal Precursor Cell-Expressed Developmentally Down-Regulated Protein 8-Activating Enzyme Inhibitor, Is a Potent Inhibitor of Hepatitis B Virus. *Hepatology* **2019**, *69*, 1903–1915.
97. Löffler, M.; Fairbanks, L.D.; Zameitat, E.; Marinaki, A.M.; Simmonds, H.A. Pyrimidine pathways in health and disease. *Trends Mol. Med.* **2005**, *11*, 430–437.
98. Wadler, S.; Gleissner, B.; Hilgenfeld, R.U.; Thiel, E.; Haynes, H.; Kaleya, R.; Rozenblit, A.; Kreuser, E.D. Phase II trial of N-(phosphonacetyl)-L-aspartate (PALA), 5-fluorouracil and recombinant interferon-alpha-2b in patients with advanced gastric carcinoma. *Eur. J. Cancer* **1996**, *32*, 1254–1256.
99. Heidrich, B.; Yurdaydin, C.; Kabaçam, G.; Ratsch, B.A.; Zachou, K.; Bremer, B.; Dalekos, G.N.; Erhardt, A.; Tabak, F.; Yalcin, K.; et al. Late HDV RNA relapse after peginterferon alpha-based therapy of chronic hepatitis delta. *Hepatology* **2014**, *60*, 87–97.
100. Enchev, R.I.; Schulman, B.A.; Peter, M. Protein neddylation: Beyond cullin-RING ligases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2015**, *16*, 30–44.
101. Decorsière, A.; Mueller, H.; van Breugel, P.C.; Abdul, F.; Gerossier, L.; Beran, R.K.; Livingston, C.M.; Niu, C.; Fletcher, S.P.; Hantz, O.; et al. Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor. *Nature* **2016**, *531*, 386–389.
102. Murphy, C.M.; Xu, Y.; Li, F.; Nio, K.; Reszka-Blanco, N.; Li, X.; Wu, Y.; Yu, Y.; Xiong, Y.; Su, L. Hepatitis B Virus X Protein Promotes Degradation of SMC5/6 to Enhance HBV Replication. *Cell Rep.* **2016**, *16*, 2846–2854.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

II. Le virus de l'hépatite B

1. Généralités

a. Découverte du HBV

Les maladies hépatiques hautement transmissibles sont connues depuis des milliers d'années et la cause majeure est le virus de l'hépatite A (HAV) qui a été le premier identifié. Entre la fin du XIX^{ème} et le début du XX^{ème} siècles, des soupçons sont apparus sur l'existence d'une forme d'hépatite, distincte du HAV, transmissible par le sang et les fluides corporels. En 1885, l'étude par Lührman d'une épidémie d'hépatite au sein d'un chantier naval de la ville de Brème a mis en évidence que seuls les employés ayant reçu un vaccin contre la variole avaient développé une hépatite (Trepo, 2014). En 1942, une épidémie d'hépatite a été observée chez 56 000 patients dans la marine de guerre américaine après une campagne de vaccination contre le virus de la fièvre jaune dont le vaccin contenait du sérum humain (Seeff *et al.*, 1987). A partir de ces observations, MacCallum a suggéré en 1947 la distinction entre deux formes d'hépatites : l'hépatite épidémique ayant une courte période d'incubation et l'hépatite sérique ou hépatite B avec un temps d'incubation long (MacCallum, 1947). Par la suite, il a été observé que l'hépatite sérique est causée par deux virus distincts. La découverte du virus de l'hépatite B (HBV) a été indirecte. Afin d'identifier et de suivre des différences génétiques dans des populations humaines, le généticien Blumberg a utilisé des sérums de personnes polytransfusées. En 1963, il a observé une réaction inhabituelle entre le sérum d'un patient hémophile et le sérum d'un aborigène australien et l'antigène identifié a été appelé *Australia antigen* (Alter, 2014). Cet antigène était retrouvé chez des patients atteints de leucémie ou du syndrome de Down. De ce fait, il a d'abord été suggéré que cet antigène était un marqueur prédictif du risque de leucémie. En 1967, un membre de l'équipe de Blumberg a développé une hépatite après avoir été en contact avec du matériel contaminé et des expériences menées par Blumberg ont permis d'établir le premier lien entre *Australia antigen* et l'hépatite (Blumberg *et al.*, 1967). *Australia antigen* a ensuite été associé à de nombreux cas d'hépatites survenant après une transfusion (Prince, 1968). A l'époque, 10 à 30 % des patients polytransfusés déclaraient une hépatite post-transfusion. Le criblage de banques de sang afin de détecter les sangs contaminés a permis de diviser par deux la survenue d'hépatite après une transfusion. Blumberg a obtenu le prix Nobel de médecine en 1976 pour ces

découvertes (Raju, 1999). En 1970, David Dane a identifié les particules infectieuses du HBV d'une taille de 42 nm, auxquelles il a donné son nom (Dane *et al.*, 1970).

b. Épidémiologie

Depuis le développement du vaccin contre le HBV en 1982, l'épidémiologie du HBV a fortement évolué. Cependant, bien que le vaccin soit globalement utilisé en routine et que les traitements antiviraux actuels permettent de réduire très fortement le risque de transmission, les infections par le HBV restent un problème de santé publique majeur (Ott *et al.*, 2012). En 2015, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estimait que 257 millions de personnes (3,5 % de la population mondiale) étaient infectées de manière chronique par le HBV, la plupart étant nées avant l'utilisation à grande échelle du vaccin (OMS, 2017b; Ott *et al.*, 2012). En 2016, seulement 27 millions de personnes avaient connaissance de leur infection (10,5 % de la population infectée par le HBV) et seulement 4,5 millions de patients diagnostiqués (16,7 % ; soit 1,7 % de la population infectée par le HBV) étaient sous traitement antiviral. En 2017, 1,1 million de personnes ont été nouvellement infectées par le HBV (OMS). En France, il est estimé que 3,2 millions de personnes ont été en contact avec le HBV et que 280 000 personnes sont atteintes d'une infection chronique par le HBV. Les infections chroniques par le HBV sont responsables de plus de 1000 décès par an en France (INSERM, <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/hepatite-b>).

Les infections par le HBV sont inégalement réparties dans le monde. En Europe, la prévalence de l'infection chronique par le HBV est de 1,6 % (15 millions de patients) et varie entre les différentes parties de l'Europe où elle est inférieure à 1 % en Europe de l'Ouest, inférieure à 1,5 % en Europe du Nord, inférieure à 2 % en Europe du Sud et inférieure à 5 % en Europe de l'Est (à l'exception de l'Ouzbékistan où la prévalence est de 8 %) (Pimpin *et al.*, 2018). Dans le monde, près de 70 % des infections chroniques par le HBV sont retrouvées dans la région du Pacifique occidental et en Afrique où les prévalences sont de 6,2 % et 6,1 %, respectivement (OMS, 2017b; Schweitzer *et al.*, 2015). La région de la Méditerranée de l'Est a une prévalence relativement élevée de 3,3 % et l'Asie du Sud-Est a une prévalence de 2 %. Enfin, les régions Nord- et Sud-Américaines ont la prévalence la plus faible de 0,7 % (Figure 25).

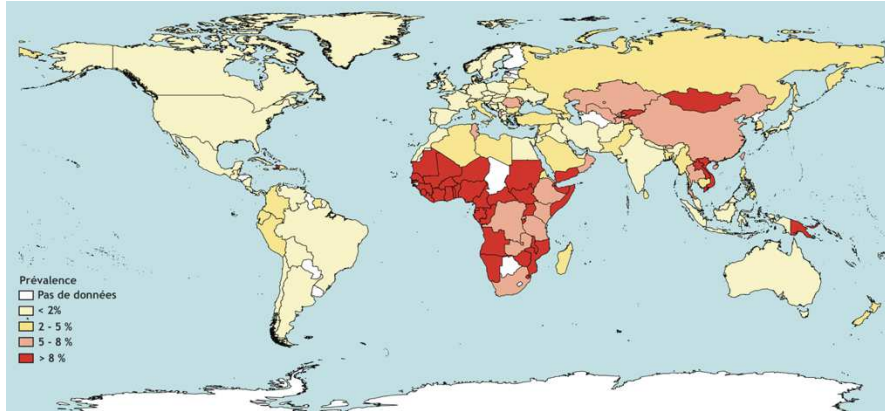


Figure 25 : Prévalence mondiale de AgHBs (1957-2013 ; adapté de Schweitzer *et al.*, 2015).

Les analyses phylogénétiques de souches du HBV ont permis d'identifier 10 génotypes majeurs (A-J) dont la différence de séquence nucléotidique entre eux est supérieure à 8 % (Okamoto *et al.*, 1988; Sunbul, 2014). Les différents génotypes sont aussi inégalement répartis dans le monde et l'infection par ces différents génotypes induit des différences dans le développement d'une infection chronique, la progression de la maladie hépatique et les réponses au traitement à base d'IFN- α (Figure 26) (Kao & Chen, 2006; Sunbul, 2014).

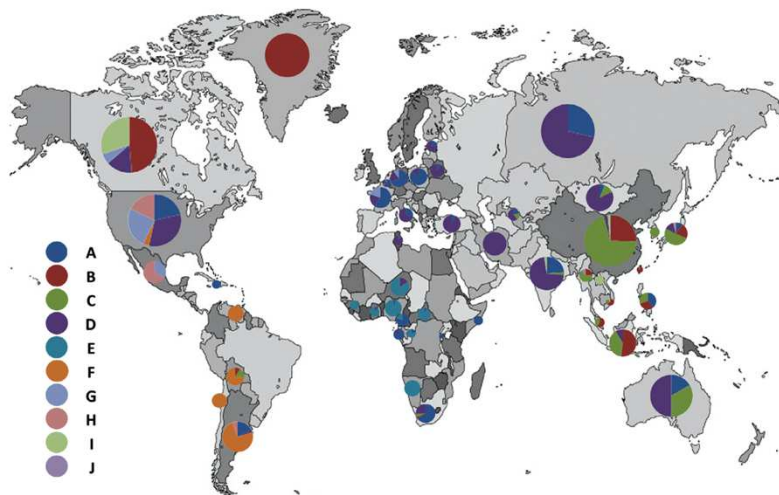


Figure 16 : Répartition géographique des génotypes du HBV (Shi *et al.*, 2013).

2. Le virus de l'hépatite B

a. Classification

Bien que le génome du HBV soit composé d'ADN, la classification récemment établie par l'ICTV l'a attribué au domaine des *Riboviria*, regroupant les virus à ARN. Il appartient à la famille des *Hepadnaviridae* composée de 5 genres ne contenant que des virus de l'hépatite B et regroupés en fonction de l'organisme qu'ils infectent. Les 5 genres retrouvés sont les *Avihepadnavirus*, regroupant les virus touchant les oiseaux, les *Herpetohepadnavirus* dont le seul représentant infecte l'amphibien *Nanorana parkeri*, les *Metahepadnavirus* dont le seul représentant infecte le poisson *Lepomis macrochirus*, les *Parahepadnavirus* dont le seul représentant infecte le poisson *Catostomus commersoni* et enfin les *Orthohepadnavirus* comprenant 12 espèces dont le HBV.

b. La particule virale du HBV

La particule virale du HBV est sphérique et a un diamètre d'environ 42 nm (Figure 27). Le génome du HBV est enfermé dans une capsidie icosaédrique composée de 120 dimères de la protéine HBc (ou Core). Les virions sont enveloppés par une membrane lipoprotéique dérivée du RE acquise par bourgeonnement à travers un corps multivésiculaire lors de l'étape d'assemblage. Dans l'enveloppe virale sont enchâssées les 3 formes de l'antigène de surface du HBV (AgHBs) : la petite (S-AgHBs), la moyenne (M-AgHBs) et la grande (L-AgHBs) (Crowther *et al.*, 1994; Dryden *et al.*, 2006; Wynne *et al.*, 1999). Les formes L-, M- et S-AgHBs sont présentes à un ratio d'environ 1:1:4 (Heermann *et al.*, 1984). La capsidie formée par les dimères de HBc renferme une seule copie du génome du HBV, sous forme d'ADN circulaire partiellement double-brin, et lié de manière covalente à la transcriptase inverse (RT) virale au niveau de l'extrémité 5' du brin complet, nécessaire à la complétion de l'ADN double brin au début du cycle viral (Kaplan *et al.*, 1973; Summers *et al.*, 1975).

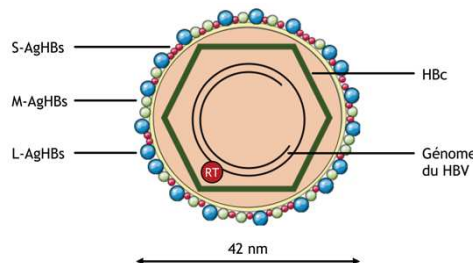


Figure 27 : Représentation schématique de la particule virale du HBV. Le génome du HBV, sous forme d'ADN circulaire partiellement double-brin) est enfermé dans une capsidie à symétrie icosaédrique composée de dimères de HBc. Le virus est enveloppé d'une membrane dérivée du réticulum endoplasmique dans laquelle sont enchâssées les 3 formes de l'antigène HBs (S-AgHBs, M-AgHBs et L-AgHBs). L'extrémité 5' du brin complet du génome du HBV est liée de manière covalente à la transcriptase inverse (RT) virale (adapté de Turon-Lagot *et al.*, 2020).

c. Les protéines d'enveloppe du HBV

Les trois formes de AgHBs sont traduites à partir d'un ORF unique contenant 3 codons d'initiation distants de 108 codons pour le premier et le second codon d'initiation et de 55 codons pour le second et le troisième codon d'initiation (Eble *et al.*, 1987). De ce fait, la séquence de la forme S-AgHBs, composée de 226 acides aminés, est également retrouvée au niveau des extrémités C-terminales de M- et L-AgHBs.

La séquence de S-AgHBs contient 4 domaines transmembranaires (TM1-4) prédits induisant l'intégration de chacune des formes dans la membrane du RE de manière co-translationnelle (Figure 28). Des boucles hydrophiles séparent chaque TM dirigeant les domaines N- et C-terminaux vers la lumière du RE (Berting *et al.*, 1995; Stirk *et al.*, 1992). La boucle hydrophile dirigée vers la lumière du RE (entre TM2 et TM3) contient un site de N-glycosylation et, se trouvant exposée à la surface du virion sécrété, constitue l'épitope conformationnel majeur de AgHBs (Gavilanes *et al.*, 1982; Patzer *et al.*, 1986). S-AgHBs est le constituant majeur de l'enveloppe virale du HBV et est nécessaire pour l'entrée du HBV et l'assemblage des virions (Bruss & Ganem, 1991; Heermann *et al.*, 1984). Dans la lumière du RE, S-AgHBs est maturée par PDI (*Protein disulfide isomerase*) permettant la formation de dimères de S-AgHBs par formation de ponts disulfures (Huovila *et al.*, 1992).

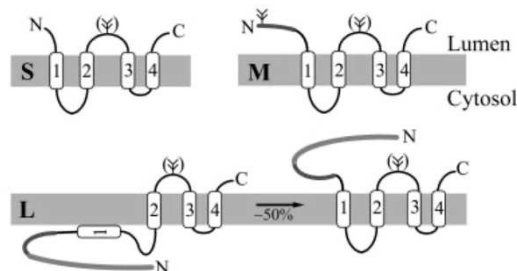


Figure 28 : Représentation schématique de la topologie des différentes formes de AgHBs. Les 4 domaines transmembranaires du domaine S sont représentés et numérotés de 1 à 4. Les sites de glycosylation sont représentés par le symbole en double flèche. Les extrémités N- et C-terminales de S-AgHBs et M-AgHBs sont orientées vers la lumière du reticulum endoplasmique (Lumen). Les deux orientations que peut adopter le domaine N-terminal de L-AgHBs sont représentés avec la conformation i-PréS à gauche et la conformation e-PréS à droite (adapté de Lambert & Prange, 2001).

M-AgHBs comporte les 4 domaines TM de S-AgHBs dans la même orientation membranaire, ainsi qu'un domaine supplémentaire en N-terminal appelé PréS2 se trouvant

dans la lumière du RE (Eble *et al.*, 1990). Le domaine Prés2 contient deux sites de modifications post-traductionnelles : un site de N-glycosylation sur l'Asn en position 4 et un site de O-glycosylation sur la Thr en position 37 (Schmitt *et al.*, 2004; Werr & Prange, 1998). La N-glycosylation de Prés2 favorise la sécrétion des différentes particules produites par le HBV, dont les particules de Dane, par son interaction avec la calnexine qui fait partie de la machinerie de contrôle qualité du RE (Lu *et al.*, 1995; Mehta *et al.*, 1997; Werr & Prange, 1998). Cependant, M-AgHBs n'étant pas nécessaire pour la production de particules virales du HBV et du HDV, son rôle dans l'assemblage et la sécrétion des particules virales reste encore méconnu (Fernholz *et al.*, 1993; Sureau *et al.*, 1993).

L-AgHBs contient les différents domaines de M-AgHBs ainsi qu'un domaine Prés1 localisé dans la région N-terminale. La particularité de L-AgHBs est qu'elle est retrouvée dans deux conformations différentes selon l'orientation de son domaine N-terminal (**Figure 28**). Les deux topologies permettent à L-AgHBs d'orienter les domaines Prés1 et Prés2 vers le cytosol (i-Prés) ou vers la lumière du RE (e-Prés) (Ostapchuk *et al.*, 1994; Prange & Streeck, 1995). La conformation i-prés est requise pour le recrutement des capsides et l'assemblage des virions. L'orientation lumineuse de la conformation e-Prés induit l'exposition du domaine N-terminal à la surface des virions qui est nécessaire à l'entrée du virus lors du cycle suivant (Kim *et al.*, 2008a; Prange & Streeck, 1995). Lors de sa synthèse, L-AgHBs est directement dirigé vers la membrane du RE et adopte exclusivement la conformation i-Prés. Le changement de conformation de L-AgHBs requiert son interaction avec BiP et le complexe formé des protéines chaperonnes Hsp40 (*Heat shock protein 40*) et Hsc70 (*Heat shock cognate 70*) et BiP, cependant les mécanismes précis régulant cette étape ne sont pas connus (Awe *et al.*, 2008; Cho *et al.*, 2003; Lambert & Prange, 2003). L'extrémité N-terminale de L-AgHBs est également myristoylée (Gripon *et al.*, 1995). Cette modification post-traductionnelle favorise l'interaction de L-AgHBs avec son récepteur et contribue à l'échappement immunitaire du HBV en protégeant les virions d'une reconnaissance par des anticorps neutralisants (Bremer *et al.*, 2011; Glebe & Urban, 2007).

d. Le génome du HBV

Le génome du HBV est enfermé dans la capside virale sous forme d'ADN circulaire partiellement double-brin d'une taille d'environ 3,2 kb (**Figure 29**). Le brin complet est le brin de polarité négative, cependant celui-ci contient une coupure au niveau d'un site unique. Le

brin de polarité positive est incomplet, donnant la structure partiellement double-brin caractéristique des *Hepadnaviridae* (Landers *et al.*, 1977; Summers *et al.*, 1975). Le génome comporte deux régions (DR1 et DR2) contenant de courtes séquences répétées d'environ 11 nucléotides nécessaires à l'initiation de la réplication virale (Haines & Loeb, 2007). L'extrémité 5' du brin de polarité négative est liée de manière covalente à la polymérase virale et encode la région DR1. Le brin de polarité positive commence par la région DR2 et comporte un oligoribonucléotide pourvu d'une coiffe attachée à son extrémité 5'. La structure circulaire du génome du HBV est permise par la présence d'extrémités cohésives localisées à l'extrémité 5' de chaque brin (Delius *et al.*, 1983).

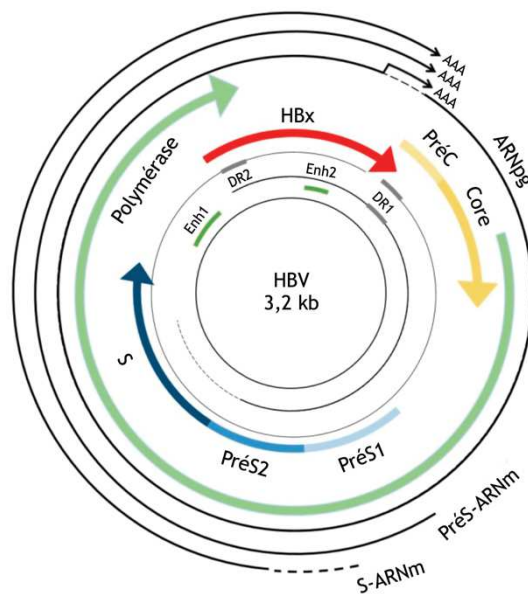


Figure 29 : Représentation schématique du génome du HBV. Le génome du HBV est composé d'un ADN double-brin circulaire de 3,2 kb contenant 4 cadres de lecture ouverts permettant l'expression de Core et de AgHBe (PréC / Core en jaune), la polymérase virale (vert), les différentes formes de AgHBs (bleu) et la protéine HBx (rouge). La transcription des différents ARN est régulée par 2 éléments enhancers (Enh1, Enh2). Le génome contient deux régions répétées directes (DR1, DR2) nécessaires à l'initiation de la réplication virale (adapté de Liu *et al.*, 2016).

Le génome du HBV est petit et possède une organisation extrêmement complexe contenant 4 ORF fortement chevauchantes ainsi que des régions régulatrices comprises dans les ORF (Kay & Zoulim, 2007; Kidd-Ljunggren *et al.*, 2002). L'ORF Pol code la polymérase virale nécessaire à la réplication virale et contenant des domaines protéine terminale (TP), transcriptase inverse (RT) et RNase H (Bartenschlager & Schaller, 1988; Clark & Hu, 2015). L'ORF préC/Core (préC/C) encode la protéine Core formant la nucléocapside ainsi que

l'antigène HBe (AgHBe). Core est exprimée à partir d'un AUG interne tandis que AgHBe, une forme sécrétée de Core, est exprimée à partir d'un AUG situé en amont. Les trois formes de AgHBs sont codées par un ORF unique et exprimées à partir de 2 ARNm différents, le plus grand exprimant L-AgHBs et le second possédant des extrémités 5' hétérogènes permettant l'expression des formes M- et S-AgHBs (Seeger & Mason, 2000; Standring *et al.*, 1984). L'ORF HBx encode la protéine HBx notamment impliquée dans la carcinogenèse (Seeger & Mason, 2000).

3. Le cycle viral du HBV

a. Attachement et entrée du HBV

Dans la circulation sanguine, le HBV arrive au contact des hépatocytes et va d'abord s'attacher avec une faible affinité aux HSPG, dont Glypican 5 (GPC5) (Verrier *et al.*, 2016a). Ces interactions font intervenir la boucle antigénique située dans le domaine S des trois formes de AgHBs (Sureau & Salisse, 2013). Récemment, NTCP (*Sodium taurocholate co-transporting polypeptide*) a été identifié comme le récepteur spécifique du HBV (**Figure 30**) (Ni *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2012). L'expression hépato-spécifique de NTCP confère le tropisme hépatique au HBV. Le domaine Prés1 myristoylé de L-AgHBs, et plus particulièrement les 48 premiers aa interagissent avec NTCP au niveau de la membrane basolatérale des hépatocytes (Glebe *et al.*, 2005; Gripon *et al.*, 1995). Les virions sont ensuite internalisés par une endocytose dépendante de la clathrine (Herrscher *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2012). Les mécanismes précis d'entrée ne sont cependant pas connus.

Après endocytose, le HBV est retrouvé dans un endosome. La translocation des endosomes contenant le HBV est régulée par deux protéines Rab, de petites GTPases faisant partie de la famille des Ras. Rab5 permet le transport de la membrane plasmique vers l'endosome précoce puis Rab7 est impliquée dans le passage de l'endosome tardif au lysosome. L'acidification de l'endosome au cours de la translocation induit la fusion de l'enveloppe du virion avec la membrane de l'endosome et le relargage de la nucléocapside virale (Hayes *et al.*, 2016). La protéine Core contient un NLS (signal de localisation nucléaire) induisant le transport de la nucléoprotéine vers le noyau *via* le réseau de microtubules (Li *et al.*, 2010; Rabe *et al.*, 2006). Au niveau du pore nucléaire, Nup153 empêche l'entrée de la nucléocapside dans le noyau et induit son désassemblage (Schmitz *et al.*, 2010). La forme phosphorylée de Pol contient un NLS bipartite (Lupberger *et al.*, 2013). La protéine Pol liée de

manière covalente au génome du HBV permet l'entrée du génome viral dans le noyau grâce à son NLS, cependant les mécanismes précis restent à élucider (Gallucci & Kann, 2017).

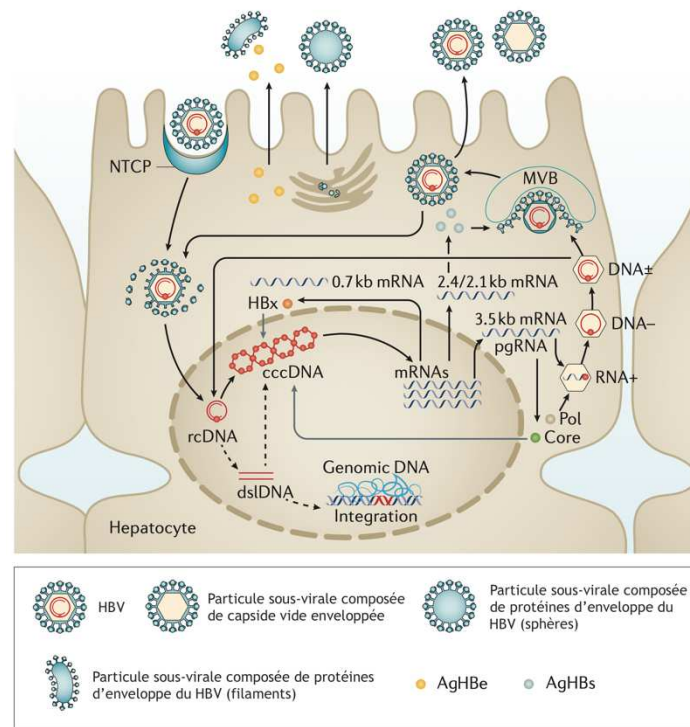


Figure 30 : Représentation du cycle viral du HBV. Les étapes principales du cycle viral du HBV sont représentées. Le virion s'attache à la surface de l'hépatocyte puis entre grâce à l'interaction spécifique avec son récepteur NTCP. Dans le cytoplasme, la capsid est libérée et le génome viral est acheminé au noyau. Le génome sous forme d'ADN circulaire relâché (rcDNA) est converti en ADN circulaire clos de manière covalente (cccDNA) adoptant une forme de minichromosome. Les différents ARN messagers (mRNA) viraux sont transcrits à partir du cccDNA et transportés dans le cytoplasme afin de permettre l'expression des protéines virales. L'ARN pré-génomique (pgRNA) est encapsidé avec la polymérase virale (Pol) et rétro-transcrit en rcDNA à l'intérieur de la capsid virale. La nucléocapsid est dirigée vers les corps multivésiculaires (MVB) dérivés du réticulum endoplasmique dans lesquels sont enchâssés les protéines d'enveloppe virale AgHBs. L'interaction entre la nucléocapsid et AgHBs induit l'enveloppement de la nucléocapsid et sa sécrétion de la cellule infectée. La nucléocapsid peut également être redirigée vers le noyau afin de maintenir l'ensemble de cccDNA. En plus des particules virales infectieuses, la cellule infectée sécrète en très grande quantité des particules sous-virales composées de AgHBs seule ou enveloppant une capsid vide. Lors de la réplication, le rcDNA peut être converti en ADN double-brin linéaire (dsIDNA). Cette forme sera préférentiellement intégrée dans le génome de la cellule hôte (adapté de Thomas et Liang, 2016).

b. Formation de l'ADNccc

Dans le noyau, le génome du HBV entre sous forme d'ADN circulaire relâché (ADNcr) partiellement double-brin (Figure 30). Afin de permettre l'expression des différentes protéines virales ainsi que sa réplication, il doit d'abord compléter la synthèse du brin de polarité positive puis adopter une forme d'ADN circulaire clos de manière covalente (ADNccc) ressemblant à un minichromosome (pour revue voir (Nassal, 2015)). TDP2 (*Tyrosyl DNA*

phosphodiesterase-2), une enzyme de réparation de l'ADN, décroche Pol de l'extrémité 5' du brin négatif de l'ADNcr par hydrolyse de la liaison phosphodiester entre Pol et l'ADNcr (Königer *et al.*, 2014). La protéine FEN1 (*Flap structure-specific endonuclease 1*) retire l'oligomère d'ARN en 5' du brin de polarité positive ainsi qu'une séquence redondante se trouvant en 5' du brin d'ADN de polarité négative (Kitamura *et al.*, 2018). La complétion du brin de polarité positive fait intervenir la polymérase virale ainsi que l'ADN polymérase cellulaire κ (Qi *et al.*, 2016). D'autres ADN polymérases cellulaires, telles que les ADN polymérases L et H, participent également à cette étape mais dans une moindre mesure. Une fois complet, le génome nécessite l'action d'une ADN ligase afin d'adopter une forme circulaire. Les ADN ligases cellulaires 1, 3 et 4 ont été identifiées comme participant à cette étape (Chang *et al.*, 2017; Long *et al.*, 2017). Le génome sous forme circulaire recrute des protéines cellulaires et virales afin d'adopter une forme de minichromosome caractéristique de l'ADNccc. Parmi les protéines cellulaires sont recrutées les histones, permettant l'enroulement et la compaction du génome, ainsi que des protéines impliquées dans des modifications épigénétiques permettant la régulation de la compaction de l'ADNccc (Bock *et al.*, 2001; Levrero *et al.*, 2009). L'ADNccc interagit également avec les protéines virales HBc et HBx, cette dernière jouant notamment un rôle dans l'activation transcriptionnelle de l'ADNccc en recrutant des facteurs de transcription et des protéines de régulations épigénétiques (Bock *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2017a; Lucifora *et al.*, 2011).

c. Synthèse des protéines et réplication virale

Une fois l'ADNccc formé, le génome du HBV sera transcrit afin de produire les différents ARNm permettant la synthèse des protéines virales. Le génome du HBV contient quatre promoteurs nommés CP, SP I, SP II et XP, ainsi que deux enhancers (Enh1 et Enh2) régulant l'initiation de la transcription du génome viral (**Figure 29**). Le génome du HBV ne contient qu'un seul signal de poly-adénylation. De ce fait, tous les ARN transcrits possèdent la même extrémité 3' (Antonucci & Rutter, 1989; Hu *et al.*, 2019a).

La transcription au niveau du promoteur Core (CP) commence à partir de 2 sites d'initiation différents, distants de 31 nt, donnant naissance à 2 ARN d'une taille d'environ 3,5 kb : l'ARN pré-génomique (ARNpg) et l'ARNm préC. L'ARNm préC est légèrement plus grand que l'ARNpg et permet la synthèse de AgHBe (Farza *et al.*, 1988; Honigwachs *et al.*, 1989; Sells *et al.*, 1988). La traduction à partir de l'ARNpg peut commencer à partir de deux

codons AUG distincts. La traduction à partir du premier codon AUG est largement majoritaire et induit la synthèse de HbC, tandis que la traduction à partir de l'AUG interne synthétise Pol (Chang *et al.*, 1989; Honigwachs *et al.*, 1989; Roychoudhury & Shih, 1990). Une partie des ARNpg synthétisés ne sera pas traduite mais interagit avec Pol afin de former un complexe ribonucléoprotéique qui sera encapsidé et servira de matrice à la réplication virale par transcription inverse (**Figure 30**).

Les ARNm synthétisés à partir des promoteurs SP I, SP II et XP ont une taille de 2,4 kb, 2,1 kb et 0,7 kb, respectivement (Caselmann & Koshy, 1998; Will *et al.*, 1987). Enh1 active principalement la transcription à partir des promoteurs CP et XP et Enh2 cible les promoteurs SP I, SP II et XP (Moolla *et al.*, 2002; Quarleri, 2014). Les différents ARNm sont transloqués dans le cytoplasme où ils sont traduits par la machinerie de traduction cellulaire. L-AgHBs est synthétisé à partir de l'ARNm 2,4 kb (PréS-ARNm) tandis que M- et S-AgHBs sont synthétisés à partir de l'ARNm 2,1 kb (S-ARNm) (**Figure 29**). Enfin, l'ARNm 0,7 kb permet la synthèse de HBx (Beck & Nassal, 2007).

d. Assemblage des nucléocapsides et transcription inverse

L'ARNpg contient en 5' la région ε structurée en tige-boucle contenant un renflement et une boucle apicale. Cette région constitue le signal d'encapsidation et est reconnue par Pol qui s'y lie afin de former un complexe ribonucléoprotéique (Junker-Niepmann *et al.*, 1990; Tavis & Ganem, 1996). Le complexe est encapsidé par des dimères de HbC afin de former des nucléocapsides et la transcription inverse a lieu à l'intérieur de ces nucléocapsides (Junker-Niepmann *et al.*, 1990). Le domaine TP de Pol contient une tyrosine dont le groupement hydroxyle est lié de manière covalente à une dGMP qui reconnaît une cytosine dans le renflement de la région ε , formant le site d'amorce de la transcription inverse (Wang & Seeger, 1992; Zoulim & Seeger, 1994). L'oligonucléotide synthétisé par complémentarité à partir de la région ε est également complémentaire du domaine DR1 (**Figure 31**). La Pol liée à l'oligonucléotide est transloquée au niveau du domaine DR1 situé en 3' de l'ARNpg permettant la synthèse du brin d'ADN de polarité négative (Tavis *et al.*, 1994; Wang & Seeger, 1993). Lors de cette étape, l'activité RNase H de Pol dégrade l'ARNpg à l'exception des 18 nucléotides situés à l'extrémité 5'. Cet oligonucléotide est coiffé, contient une copie complète de DR1 et sert d'amorce pour la synthèse du brin d'ADN de polarité positive (Haines & Loeb, 2007; Loeb *et al.*, 1991). L'oligonucléotide subit une première translocation au niveau de la

région DR2 complémentaire à DR1 et se trouvant dans la région 5' de l'ADN de polarité positive. La synthèse du brin de polarité négative commence, puis, lorsque l'élongation arrive vers l'extrémité 5' de l'ADN de polarité positive, une seconde translocation a lieu par complémentarité du brin d'ADN de polarité négative avec l'extrémité 3' du brin de polarité positive (Habig & Loeb, 2006; Nassal, 2008).

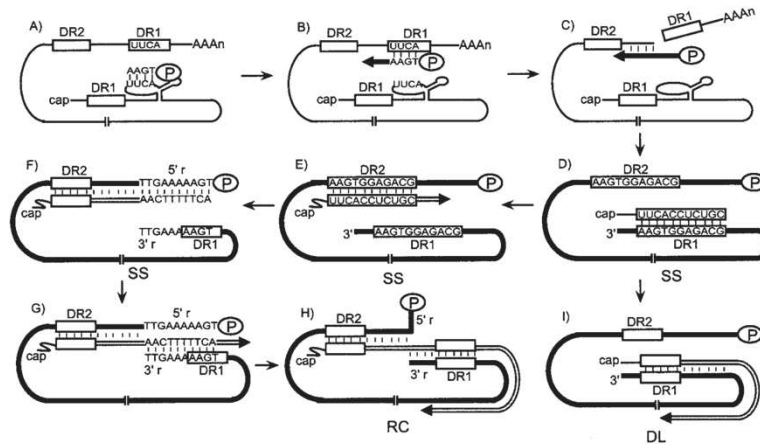


Figure 31 : Représentation des étapes de la transcription inverse du HBV. (A) L'initiation de la synthèse du brin d'ADN de polarité négative a lieu au niveau de la tige-boucle ϵ de l'ARNpg. La polymérase virale (P) sert d'amorce et synthétise les 3-4 premiers nucléotides en utilisant le renflement de la tige-boucle ϵ comme matrice. (B) Le brin d'ADN de polarité négative est transloqué dans la région 3' de l'ARNpg, où sa séquence est complémentaire avec une partie de la région DR1, et sa synthèse reprend. (C) Le brin d'ADN de polarité négative est synthétisé et l'activité RNase H de Pol dégrade l'ARNpg servant de matrice. (D) La synthèse de l'ADN de polarité négative est complète et l'ARNpg est entièrement dégradé à l'exception de son extrémité 5' contenant DR1 et servant d'amorce pour la synthèse du brin d'ADN de polarité positive. (E) L'amorce du brin d'ADN de polarité positive subit une première translocation dans la région 5' de l'ADN de polarité positive où la région DR1 est complémentaire à la région DR2. (F) La synthèse du brin d'ADN de polarité positive reprend et arrive au niveau de l'extrémité 5' du brin d'ADN de polarité négative. (G) Une seconde translocation du brin d'ADN de polarité positive a lieu par complémentarité avec la région 3' du brin d'ADN de polarité négative permettant de poursuivre la synthèse. (H) La synthèse de l'ADN de polarité positive se poursuit afin de former l'ADNrc (RC). (I) Si la première translocation de l'ADN de polarité positive n'a pas lieu, la synthèse du brin continue et donne naissance à une ADN double-brin linéaire (DL) (adapté de Liu *et al.*, 2004).

Si la première translocation du brin de polarité négative n'a pas lieu, la synthèse continue mais donne naissance à un ADN double-brin linéaire. Lors d'un nouveau cycle viral, cette forme de génome du HBV est généralement intégrée dans le génome de l'hôte et sert de matrice à la transcription des 2 ARNm permettant la synthèse des trois formes d'AgHBs (Figure 30) (Nassal, 2008; Yang & Summers, 1999). L'intégration du génome du HBV dans le génome de la cellule hôte a été longtemps perçue comme un phénomène rare. Cependant, une étude récente montre que l'intégration pourrait être beaucoup plus courante avec un taux d'intégration de 0,84 par génome diploïde (Podlaha *et al.*, 2019). L'intégration du

génomique virale participe à l'initiation et à la progression du CHC notamment en induisant lors de l'intégration des mutations dans des gènes impliqués dans le CHC et menant à leur surexpression ou en induisant une instabilité chromosomique (Tu *et al.*, 2017). Les mécanismes fins menant à l'initiation du CHC restent à élucider.

e. Devenir des nucléocapsides et sécrétion des virions

Durant l'étape de transcription inverse, les nucléocapsides formées ont deux devenir différents. Celles-ci peuvent transiter à nouveau vers le noyau afin de libérer l'ADNcr et de former de nouvelles molécules d'ADNccc permettant de maintenir un ensemble d'ADNccc suffisant (Tuttleman *et al.*, 1986; Wu *et al.*, 1990). D'autres seront enveloppées afin de former de nouveaux virions puis sécrétées (**Figure 30**). La régulation du devenir de la nucléocapside est dépendante du ratio entre L-AgHBs et la nucléocapside (Summers *et al.*, 1990). Une fois synthétisées, les différentes formes de AgHBs sont maturées dans le RE puis dans l'appareil de Golgi et sont intégrées dans la membrane de corps multivésiculaires (MVB). La nucléocapside virale interagit avec la partie cytoplasmique du domaine PrÉS1 de L-AgHBs au niveau des corps multivésiculaires induisant l'enveloppement et le bourgeonnement de la particule virale au travers de la membrane (Bruss, 2007). Le bourgeonnement nécessite les formes L- et S-AgHBs, cependant M-AgHBs n'est pas nécessaire (Bruss & Ganem, 1991; Tan *et al.*, 1999). Le bourgeonnement à travers la membrane du corps multivésiculaire ainsi que la sécrétion des particules virales font intervenir le complexe ESCRT cependant le mécanisme reste inconnu (Hu & Liu, 2017; Patient *et al.*, 2009).

4. Physiopathologie de l'hépatite B

a. Infection aiguë résolutive

Le HBV est non-cytopathique et les manifestations cliniques de l'hépatite ainsi que les maladies hépatiques découlant d'une infection chronique sont principalement dues à l'immunité adaptative de l'hôte, notamment par la production de lymphocytes T cytotoxiques (Chisari & Ferrari, 1995). Cependant, l'infection aiguë par le HBV est éliminée chez 95 % des patients adultes grâce à la coordination des immunités innée et adaptative. Durant les premières semaines suivant l'exposition au HBV, le virus n'est pas détectable dans le sérum, ni dans le foie. L'immunité innée induite dans cette période est transitoire et très faible, ayant donné l'idée que le HBV est un virus furtif capable d'échapper à l'immunité innée (Guy *et al.*,

2008; Verrier *et al.*, 2018; Wieland *et al.*, 2004). Durant cette phase, la production de virus est exponentielle. Le virus devient détectable dans le sang et une réponse immunitaire spécifique impliquant des lymphocytes T (LT) CD4⁺ et CD8⁺ se met en place (Webster *et al.*, 2000). La réponse lymphocytaire doit être régulée car la destruction d'un trop grand nombre d'hépatocytes peut entraîner une défaillance hépatique et une hépatite fulminante, observée chez 1 % des patients lors d'une infection aiguë (Ichai & Samuel, 2019; Lee, 1993). Les LT CD8⁺ spécifiques du HBV sécrètent de l'IFN- γ et du TNF- α capables d'inhiber la réplication du HBV et de diminuer la quantité d'ADNccc sans tuer la cellule hôte (Xia *et al.*, 2016). Des lymphocytes B produisent des anticorps neutralisants ciblant AgHBs permettant d'empêcher l'infection de nouvelles cellules (Shin *et al.*, 2016). De ce fait, la résolution d'une infection aiguë par le HBV fait intervenir différents mécanismes cytopathiques et non-cytopathiques (Xia & Protzer, 2017). Cependant, les différents mécanismes impliquent majoritairement la réponse immunitaire adaptative, expliquant pourquoi l'immaturation du système immunitaire adaptatif chez les enfants induit une progression vers une hépatite B chronique dans 30 % des cas pour les enfants de moins de 5 ans et dans 90 % des cas pour les nouveau-nés (McMahon *et al.*, 1985; Sokal *et al.*, 2013).

b. Infection chronique

i. Phases de l'infection chronique

L'infection chronique par le HBV a été divisée en 3 phases caractérisées dépendantes du statut immunitaire du patient ainsi que de la détection de AgHBe (Yim & Lok, 2006). La première phase, anciennement appelée phase de tolérance immunitaire, est l'infection chronique AgHBe-positif (Figure 32). Elle est principalement retrouvée lorsque l'infection survient chez de très jeunes patients et peut durer plusieurs dizaines d'années. Cette phase est caractérisée par une réplication très active du HBV, détectée par la présence de AgHBe dans le sérum ainsi qu'un titre viral élevé, et une histologie hépatique quasi-normale due à une réponse immunitaire de l'hôte très faible.

La seconde phase est caractérisée par l'activation de l'immunité de l'hôte lors d'une réplication virale élevée et était appelée phase de clairance immunitaire. La réponse immunitaire mise en place implique principalement des lymphocytes T et est accompagnée d'une baisse de l'ADN du HBV. Cependant, l'immunité ne contrôle pas efficacement l'infection et plusieurs rebonds d'infection sont généralement observés. La réponse lymphocytaire induit

Introduction – Partie II

une augmentation des ALT (alanine aminotransférase), caractéristique d'une inflammation et de dommages hépatiques pouvant causer une fibrose et une cirrhose hépatiques. Cette phase dure plusieurs années et n'est généralement pas ou très peu symptomatique. Elle se termine lorsque la séroconversion anti-AgHBe est mise en place (apparition des anticorps anti-AgHBe) et que la quantité d'ADN du HBV reste basse.

La troisième phase est celle du contrôle par le système immunitaire et est caractérisée par une absence de détection de AgHBe grâce à la séroconversion. Environ 15 % des patients développent une séroconversion anti-AgHBe par an. La séroconversion est accompagnée d'une forte baisse de la quantité d'ADN du HBV ainsi que de l'inflammation hépatique. Si la maladie hépatique due à la phase de clairance immunitaire n'est pas trop avancée, la séroconversion anti-AgHBe est un marqueur de bon pronostic et diminue très fortement le risque de développement d'un CHC. En revanche, la séroconversion anti-AgHBe chez un patient n'est pas forcément synonyme de baisse de la réplication virale. En effet, deux études sur des cohortes de patients ont montré que la séroconversion anti-AgHBe avait induit la sélection de virus mutés dans le promoteur de Core et n'exprimant plus AgHBe (Laras *et al.*, 1998; Yuan *et al.*, 2007).

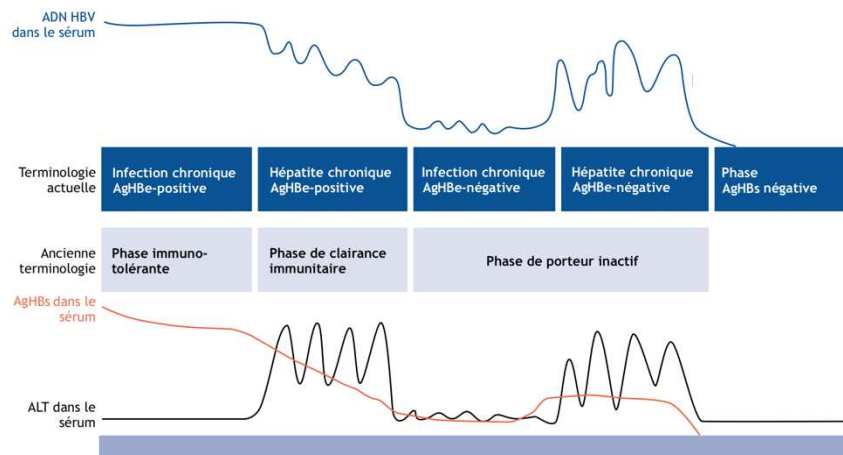


Figure 32 : Cinétiques de la présence de l'ADN HBV, de AgHBs et d'ALT (alanine aminotransférase) dans le sérum décrivant différentes phases de l'infection chronique par le HBV (adapté de Seto *et al.*, 2018).

ii. Mécanismes viraux permettant la chronicité

L'immunité adaptative étant principalement impliquée dans l'élimination du HBV lors de l'infection chronique, l'âge du patient infecté et donc la maturité du système immunitaire adaptatif sont des caractères prédominants dans la progression vers une infection chronique.

En plus d'être un virus furtif, le HBV contrecarre les immunités innée et adaptative par différents mécanismes. Smc5/6 (*Structural maintenance of chromosomes 5/6*) inhibe la transcription à partir de l'ADNccc. HBx recrute Smc5/6 et le complexe DDB1–CUL4–ROC1 (CRL4) E3 ligase, induisant l'ubiquitinylation de Smc5/6 et sa dégradation (Decorsière *et al.*, 2016; Sekiba *et al.*, 2019). A l'inverse, HBx inhibe la dégradation de protéines du HBV par le protéasome, empêchant la présentation d'antigènes du virus et la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative. L'inhibition du protéasome par HBx favorise également la réplication du HBV (Hu *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2010). Pol prévient l'expression d'ISG et la mise en place de l'état antiviral cellulaire en inhibant la translocation nucléaire de STAT1 lors d'une stimulation à l'IFN- α (Wu *et al.*, 2007). Plusieurs études ont observé la diminution de l'expression de TLR2 et TLR3 dans les hépatocytes et les CK de patients infectés de manière chronique par le HBV (Chen *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2013; Visvanathan *et al.*, 2007). De plus, la diminution de l'expression de TLR8 et TLR9 a également été observée dans les pDC et les monocytes, respectivement (Deng *et al.*, 2017; Xie *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2012). Bien que les différents mécanismes ne soient pas connus, la diminution de l'expression de plusieurs TLR par le HBV induit une baisse de la production de cytokines antivirales et pro-inflammatoires et de la mise en place d'une réponse immunitaire. Lors de la réplication virale, le HBV produit des particules sous-virales (SVP), enveloppées par AgHBs, dans des proportions très largement supérieures à la production de particules de Dane (**Figure 30**) (Seeger & Mason, 2000). Les SVP produites servent de leurre et masquent les particules de Dane dans la circulation, induisant un épuisement de LT et diminuant la réponse immunitaire adaptative du patient (Churin *et al.*, 2015; Rydell *et al.*, 2017).

c. Progression vers le CHC

Selon une étude récente de 2018, le CHC est le sixième cancer le plus diagnostiqué (4,7 % de tous les cancers diagnostiqués) et le quatrième cancer le plus mortel (8,2 % de la mortalité totale par cancer) (GLOBOCAN, 2018). Les infections par le HBV sont responsables de plus de 50 % des cas de CHC, atteignant jusqu'à 78 % dans les régions fortement touchées par le CHC (Rapti & Hadziyannis, 2015). L'inflammation chronique ainsi que l'activation prolongée du système immunitaire adaptatif sont deux des facteurs majoritairement impliqués dans la progression de la maladie hépatique vers le CHC. Le HBV est également responsable de plusieurs perturbations intracellulaires favorisant la progression vers le CHC.

i. Les rôles de HBx

HBx est synthétisée à partir du 4^{ème} ORF du génome du HBV et est fortement impliquée dans la réplication virale (Lucifora *et al.*, 2011). HBx a été décrite comme impliquée dans la perturbation de nombreuses voies de signalisation régulant le métabolisme cellulaire, la réponse immunitaire ou la prolifération et la survie cellulaires. Cette protéine est faiblement exprimée lors d'une infection par le HBV. De ce fait, de nombreuses études ont été réalisées en condition de surexpression de HBx et pourraient ne pas refléter l'impact exact de l'expression de HBx lors d'une infection naturelle par le HBV.

HBx active la prolifération et la survie cellulaires ainsi que la migration en ciblant différentes voies de signalisation. HBx interagit avec p53 afin de perturber son rôle de contrôle du cycle cellulaire et de favoriser la survie cellulaire (Ahn *et al.*, 2002; Knoll *et al.*, 2011). Lors de la division cellulaire, HBx interagit avec plusieurs protéines, dont DDB1 (*UV-damaged DNA binding protein 1*), induisant un défaut dans la formation du fuseau mitotique ainsi qu'une mauvaise ségrégation et une instabilité chromosomiques (Kim *et al.*, 2008b; Martin-Lluesma *et al.*, 2008; Wen *et al.*, 2008b). HBx interagit avec CBP/p300 et empêche l'inactivation de CREB par PP1, induisant l'activation de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire (Cougot *et al.*, 2007, 2012). La dérégulation de ces différentes voies de signalisation peut induire une prolifération accrue des cellules et la progression vers le CHC. De plus, dans le CHC, HBx active l'expression de HIF-1 α (*Hypoxia-inducible factor-1 α*) et stabilise la protéine. Elle active également l'expression de VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) et de l'angiopoiétine 2. L'expression de ces différents facteurs favorise l'angiogenèse et le développement du CHC (Sanz-Cameno *et al.*, 2006; Yoo *et al.*, 2003).

ii. Intégration du HBV

Le HBV utilise une transcriptase inverse pour la réplication de son génome. Cependant, contrairement aux Rétrovirus, le HBV ne nécessite pas d'étape d'intégration de son génome dans le génome de la cellule hôte pour compléter son cycle. Son génome est généralement retrouvé sous forme d'ADNccc formant un minichromosome dans le noyau de la cellule hôte. Lors de la transcription inverse, il est possible qu'une étape de translocation n'ait pas lieu et que la réaction donne naissance à un ADN double brin linéaire (**Figure 30**). Dans le noyau, le

génomique du HBV sous cette forme sera préférentiellement intégré dans le génome de l'hôte (Nassal, 2008; Yang & Summers, 1999). L'intégration du HBV a été détectée dans environ 90 % des CHC associés au HBV et est fortement corrélée à la carcinogenèse (Bréchot *et al.*, 2000; Minami *et al.*, 2005). Durant plusieurs années, il était admis que l'intégration du HBV se faisait de manière aléatoire. Récemment, une étude a montré que le génome du HBV s'intègre préférentiellement dans des sites chromosomiques dits fragiles (plus aptes à subir un réarrangement lors de cancers) ou dans des sites fonctionnels dont les îlots CpG (Zhao *et al.*, 2016). Dans les cellules tumorales, le HBV est également retrouvé intégré à proximité des télomères. L'intégration peut induire une dérégulation de l'expression d'un gène impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire ou induire une instabilité génomique pouvant conduire au développement d'un CHC. L'intégration du génome du HBV à proximité d'un élément LINE1 (*Long interspersed nuclear element 1*) du chromosome 8 a récemment été décrite, donnant naissance à un transcrite chimérique HBx-LINE1 (Lau *et al.*, 2014). Ce transcrite joue un rôle d'ARNInc (ARN long non-codant) et est impliqué dans le développement du CHC, notamment par activation de la voie Wnt/ β -caténine. Cet ARN chimérique sert d'éponge pour le miR-122, diminuant fortement son expression et empêchant son action de régulation de différentes voies du métabolisme hépatique (Liang *et al.*, 2016).

5. Prévention et traitements

a. Vaccination

Le premier vaccin contre le HBV était dérivé de sérum de patients infectés par le HBV de manière chronique. La première étude de ce vaccin a été réalisée en France sur des patients et le personnel de 3 services d'hémodialyse (Maupas *et al.*, 1976). Le suivi des personnes vaccinées a permis de mettre en évidence la capacité de la vaccination à induire une production soutenue d'anticorps ciblant AgHBs (Barin *et al.*, 1978). Ce vaccin a été mis sur le marché en 1981 puis a ensuite été remplacé en 1986 et en 1989 par des vaccins contenant l'antigène HBs recombinant (Davis, 2005). Dans les pays où la prévalence du HBV est élevée, l'OMS recommande l'injection de la première dose de vaccin dans les 24 heures suivant la naissance d'un nourrisson (OMS, 2018). Le protocole de vaccination requiert ensuite 2 injections de rappel permettant d'amplifier et de maintenir la réponse immunitaire acquise (OMS, 2017a). L'administration des 3 doses de vaccin contre le HBV permet une immunisation de plus de 95 % des enfants (OMS, 2016). En France, la vaccination pour les nouveau-nés est

obligatoire depuis le 1^{er} janvier 2018 et comprend 3 injections à 2 mois, 4 mois et 11 mois. Le schéma de vaccination pour des nouveau-nés de mère ayant une hépatite B chronique est différent et comprend une injection à la naissance associée à l'administration d'immunoglobulines spécifiques, puis une injection à 1 mois et une dernière à 6 mois (Vaccination Info Service, <https://vaccination-info-service.fr/Les-maladies-et-leurs-vaccins/Hepatite-B>).

Depuis 2005, les pays de l'Océanie et de l'Asie de l'Est vaccinent les enfants contre le HBV. Dans ces régions, il est estimé que la vaccination des enfants entre 1990 et 2014 a permis d'empêcher l'infection de 37 millions d'enfants et de prévenir 7 millions de morts dues au HBV (Wiesen *et al.*, 2016). En Europe, les programmes de vaccination ont permis d'atteindre une prévalence du HBV de 0,4 % (contre 3,5 % pour la population mondiale). De plus, la majorité des patients infectés sont des adultes nés avant la disponibilité des vaccins au début des années 1990 (OMS, 2017b). En Italie par exemple, l'un des premiers pays européens à rendre la vaccination HBV obligatoire dès 1991, la prévalence a chuté de 3,4 % en 1986 à 0,9 % en 1996 (Da Villa, 2000). Les programmes de vaccination ont permis de diminuer la prévalence du HBV chez les enfants de moins de 5 ans de 4,7 % à 1,3 %, alors que la prévalence reste élevée dans les populations non-vaccinées (OMS, 2017b).

b. Traitements

i. Les concepts de guérisons du HBV

Dans la définition de la guérison du HBV, trois concepts clés existent. La guérison virologique, également appelée clairance virale, est la plus complète et est caractérisée par la perte complète de l'ADN du HBV dans le sang et dans le foie accompagnée d'une production d'anticorps anti-HBc. Cependant, les traitements actuels sont incapables d'éliminer efficacement l'ADNccc des hépatocytes infectés et cette guérison ne peut être atteinte (Baumert *et al.*, 2015). La guérison fonctionnelle est atteinte lorsqu'après arrêt du traitement, la perte de détection de AgHBs ainsi que de l'ADN du HBV dans le sang est maintenue. La guérison fonctionnelle est atteinte pour jusqu'à 11 % des patients traités avec de l'interféron (Buster *et al.*, 2008; Lau *et al.*, 2005). Le troisième concept est la guérison partielle, caractérisée par l'absence de détection de l'ADN du HBV dans le sang et une perte de AgHBe maintenues après arrêt du traitement (Lok *et al.*, 2017).

ii. L'IFN- α pégylé

L'IFN- α est une cytokine sécrétée par l'organisme afin d'induire une réponse immunitaire innée et un état antiviral. Il a un effet direct sur l'infection par le HBV en induisant la dégradation de l'ADNccc et l'inhibition de la transcription des ARNm viraux, ainsi qu'un effet indirect en activant fortement l'immunité innée de l'hôte participant à l'élimination des hépatocytes infectés et à la clairance virale. Les mécanismes précis ne sont cependant pas connus (Asselah *et al.*, 2007; Woo *et al.*, 2017). Le traitement à l'IFN- α pégylé dans le cas d'une infection par le HBV dure 48 semaines à raison d'une injection par voie sous-cutanée par semaine. Les résultats d'essais cliniques et de suivi de patients ont montré une réponse thérapeutique impliquant la perte de l'ADNccc, de AgHBe et de AgHBs ainsi qu'une amélioration de l'histologie hépatique (Lin *et al.*, 2007; Marcellin *et al.*, 2009; van Zonneveld *et al.*, 2004). Cependant, ces résultats ne sont observés que chez 10 à 30 % des patients. De plus, le traitement à l'IFN- α pégylé est responsable de nombreux effets secondaires graves pouvant mener à l'arrêt du traitement ou à la dépression du patient traité (Lau *et al.*, 2005; Marcellin *et al.*, 2004). Le faible taux de réponse et la mauvaise tolérance du traitement à l'IFN- α ont rendu nécessaire le développement d'autres stratégies thérapeutiques dans le traitement de l'hépatite B.

iii. Les analogues de nucléos(t)ides

Les analogues de nucléos(t)ides sont des inhibiteurs de la transcriptase inverse du HBV et empêchent la conversion de l'ARNpg en ADN (Fung *et al.*, 2011). Actuellement, 5 analogues de nucléos(t)ides sont commercialisés : adefovir, entecavir, lamivudine, tenofovir disoproxil et tenofovir alafenamide. Lamivudine et adefovir ont été les premiers développés, cependant l'apparition de variants du HBV résistants au traitement sont apparus et limitent l'utilisation de ceux-ci. En effet, jusqu'à 30 % des patients sont devenus partiellement résistants au traitement après 2 ans pour lamivudine et 5 ans pour adefovir (Chan *et al.*, 2007; Hadziyannis *et al.*, 2006). Plus récemment, les études utilisant entecavir ou tenofovir disoproxil ont montré des taux d'apparition de résistance très faible avec un taux de 1,2 % après 5 ans de traitement avec entecavir et aucun variant identifié après 7 ans de thérapie utilisant tenofovir disoproxil (Buti *et al.*, 2015; Tenney *et al.*, 2009). Un essai clinique a montré qu'après 16 semaines de traitement, entecavir a permis de rendre indétectable l'ADN HBV dans le sang chez 80 % des

patients et une séroconversion AgHBe chez 30 % des patients (Gish *et al.*, 2007). Une étude sur l'efficacité de tenofovir disoproxil a montré qu'après 48 semaines de traitement, 81 % des patients ont atteint un niveau d'ADN du HBV circulant de moins de 400 copies/ml (Berg *et al.*, 2010). Le suivi à 7 ans de patients atteints du HBV traités par tenofovir disoproxil a montré que chez les patients initialement positifs à AgHBe, 54,5 % et 11,8 % sont devenus négatifs pour AgHBe et AgHBs, respectivement. De plus, l'ADN du HBV était indétectable dans le sang chez 99,3 % des patients (Buti *et al.*, 2015). Le traitement à long terme avec tenofovir disoproxil est bien toléré avec uniquement 1,0 % des patients ayant reporté des effets secondaires forts tels qu'une pancréatite aiguë, une ostéopénie, une ostéoporose ou une insuffisance rénale. Deux essais cliniques de phase 3 ont montré que le tenofovir alafenamide a une meilleure stabilité plasmatique, une efficacité similaire au tenofovir disoproxil et induit des effets secondaires rénaux et osseux moins prononcés (Buti *et al.*, 2016; Chan *et al.*, 2016). Cependant, ce traitement étant plus récent, des études sur plus de patients et de suivi à long terme sont nécessaires. De par leur efficacité et leur bonne tolérance, entecavir, tenofovir disoproxil et tenofovir alafenamide sont les thérapies utilisées en première intention. Cependant, ces traitements ne permettent une guérison fonctionnelle que dans une minorité de cas (Buti *et al.*, 2015). Chez les patients n'atteignant pas la guérison fonctionnelle, la chronicité de l'infection persiste, ceci étant dû à la persistance du génome du HBV sous forme d'ADNccc dans les hépatocytes infectés qui n'est pas ciblé par les traitements actuels. Des recherches sont de ce fait nécessaires afin de découvrir les facteurs d'hôte impliqués dans la formation de l'ADNccc et dans sa persistance afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant ces facteurs (Nassal, 2015).

III. L'étude des interactions virus-hôte par criblage à haut débit

1. Introduction

Les infections virales représentent un problème de santé publique majeur. La variété des infections virales ainsi que les pathogénèses associées accentuent la complexité de la lutte contre ces infections. De nos jours, deux situations existent et amènent des stratégies de recherche différentes.

La première concerne les virus dont l'infection chronique mène au développement de cancers ou à la déficience du système immunitaire. Certaines, dont les infections aux *human*

papillomavirus (HPV) 16 et 18 n'ont aucun traitement connu. Les infections aux HPV 16 et 18 sont responsables de 70 % des cancers du col de l'utérus et sont également responsables du développement d'autres cancers oraux, génitaux et anaux (Brianti *et al.*, 2017; Harper & DeMars, 2017). Plusieurs vaccins existent afin de prévenir les infections aux HPV 16 et 18. L'introduction de la vaccination anti-HPV en Angleterre en 2008 a permis d'atteindre un taux de 90 % de vaccination chez les filles de 12-13 ans en 2013 (Hilton *et al.*, 2013). En France, la méfiance vis-à-vis de la vaccination ainsi que le manque de directives claires ont conduit à une couverture vaccinale de seulement 23,7 % des filles de 16 ans entre 2016 et 2018 (Fontenau, 2019). De plus, la vaccination des garçons, pourtant montrée comme nécessaire depuis plusieurs années, n'entrera en vigueur qu'en 2021 (Santé Publique France, 2020). Le développement de traitements antiviraux pourrait permettre d'éliminer le virus et de prévenir l'apparition de cancers chez les personnes infectées. Cependant, le HPV n'encode qu'une seule enzyme, E1, et empêche l'utilisation d'antiviraux classiques (Archambault & Melendy, 2013). Puisqu'il repose principalement sur la machinerie de son hôte, l'étude des interactions virus-hôte est nécessaire pour la découverte et le développement de nouvelles molécules antivirales. D'autres infections, comme les infections au HIV ou au HBV, ont des traitements connus. Cependant, ces traitements ne permettent pas d'éliminer le virus et nécessitent donc d'être pris tout au long de la vie (Günthard *et al.*, 2016; Ward *et al.*, 2016). Enfin, les infections par le HCV ont pendant longtemps été traitées avec de l'IFN- α pégylé, ayant une efficacité faible et provoquant de forts effets secondaires. La découverte d'agents antiviraux à action directe (DAA – *direct-acting antiviral*), ciblant l'activité des protéines virales, a été une véritable révolution et a permis le développement de traitements éliminant l'infection virale dans plus de 90 % des cas (Baumert *et al.*, 2019). Cependant, le HCV mute rapidement et plusieurs cas de résistance aux traitements ont été observés. De ce fait, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant les protéines de l'hôte nécessaires à l'infection virale pourrait limiter l'apparition de résistances. De plus, les DAA n'ont pas systématiquement une efficacité similaire contre les différents génotypes d'un même virus du fait de leur variabilité génétique (Zeuzem *et al.*, 2014). La stratégie thérapeutique antivirale de cibler une protéine de l'hôte permet à la fois de développer des traitements contre les virus n'ayant pas ou peu de fonctions enzymatiques (HDV ou HPV) et limite l'apparition de résistance aux traitements, qui est une notion particulièrement importante pour les infections virales chroniques nécessitant un traitement à long terme.

La seconde situation concerne les virus émergents responsables d'épidémies mais n'induisant pas d'infection chronique. Depuis le début du XXI^{ème} siècle plusieurs épidémies virales ont eu lieu dont les épidémies de SARS-CoV-1 (*severe acute respiratory syndrome-Coronavirus-1*) en 2003 (Cherry & Krogstad, 2004), d'*influenza A virus* (IAV) H1N1 en 2009 (Girard *et al.*, 2010), de MERS-CoV (*Middle Eastern respiratory syndrome-Coronavirus*) en 2012 (Zumla & Memish, 2014), du virus Ébola entre 2014 et 2016 (Hasan *et al.*, 2019), du virus Zika entre 2015 et 2016 (Kazmi *et al.*, 2020) ou encore l'épidémie de SARS-CoV-2 qui a démarré fin 2019 (Wang *et al.*, 2020). Ces épidémies, résultant principalement de zoonoses, sont aggravées par l'augmentation de la densité démographique dans les espaces urbains ainsi que la mondialisation facilitant la propagation du virus à travers le monde. Ces virus induisent une infection aiguë pouvant être responsable de symptômes graves et conduire au décès du patient infecté. La plupart de ces virus possèdent un taux de mutation élevé rendant difficile le développement de vaccins ciblant une majorité de génotypes ou conduisant à l'émergence rapide de résistance à certains traitements. La robotisation d'expériences de laboratoire ainsi que les progrès en bio-informatique permettent l'étude détaillée des interactions entre le virus et son hôte par diverses techniques de criblage à haut débit. Les études des interactions virus-hôte ont notamment permis de mieux comprendre le rôle de protéines cellulaires dans les cycles viraux. Les différentes connaissances apportées par les criblages ont mené au développement de nouvelles solutions thérapeutiques, dont des molécules ciblant l'hôte, ayant une activité antivirale sur une majorité de génotypes d'un même virus. Certaines de ces molécules sont disponibles sur le marché et d'autres sont actuellement en essai clinique (Smed-Sørensen *et al.*, 2018).

2. Les criblages HIV et la découverte du maraviroc

Actuellement, tous les traitements contre le HIV disponibles sur le marché, à l'exception du maraviroc, ciblent des protéines virales. Ces traitements n'amenant pas à une clairance virale, ils doivent être pris durant toute la vie du patient infecté. Le HIV mute rapidement et la durée des traitements peut entraîner l'apparition de résistances (Daniyal *et al.*, 2016). Afin d'étudier les interactions entre le HIV et son hôte, 4 criblages par perte de fonction ont été réalisés, dont 3 ont utilisé une banque de siARN et 1 a utilisé une banque de shARN (*short-hairpin* ARN) (Brass *et al.*, 2008; König *et al.*, 2008; Yeung *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2008). En 2009, une méta-analyse combinant les résultats des criblages siARN ainsi que les

données obtenues à partir d'étude d'interactions HIV-hôte individuelles a recensé 2410 gènes potentiellement impliqués dans l'infection par le HIV (soit près de 10 % des gènes codés par le génome humain). Cependant, le chevauchement entre les différents criblages était inférieur à 7 %. Ce taux très faible indique que les résultats obtenus sont fortement dépendants des conditions expérimentales du criblage (Bushman *et al.*, 2009). La méta-analyse a permis d'identifier des voies communes aux différents criblages dont le complexe médiateur (MED), nécessaire à l'association de l'ARN polymérase II avec des facteurs de transcription, ainsi que le transport vésiculaire de l'appareil de Golgi. Le quatrième criblage a impliqué la transduction d'une lignée cellulaire Jurkat, dérivée de lymphocytes T, avec des lentivirus exprimant des shARN ciblant près de 55 000 transcrits humains. La survie des cellules après infection par le HIV indique que le gène dont l'expression est diminuée est potentiellement nécessaire à l'infection par le HIV. L'étude a identifié 252 ARNm dont 5 ont été validés de manière fonctionnelle. *NRF1* est impliquée dans l'expression du corécepteur CXCR4, la diminution de l'expression de *STXBP2* diminue la transcription inverse, *PRDM2* et *NCOA3* participent à la transcription du HIV et *EXOSC5* est impliqué dans le transport de Gag (Yeung *et al.*, 2009).

Un criblage par gain-de-fonction a également été réalisé à l'aide d'une banque de lentivirus exprimant 15.000 gènes humains transduits dans une lignée HeLaCD4βgal permissive à l'infection par le HIV. Le séquençage des cellules dont l'expression du rapporteur est au moins doublée a permis l'identification de 315 gènes potentiellement impliqués dans le cycle du HIV (Nguyen *et al.*, 2007). Parmi ces gènes, plusieurs étaient déjà connus comme *S100A12* qui active la transcription du HIV ou l'exportine CRM1 impliquée dans l'export des ARN du HIV (Ryckman *et al.*, 2002; Wodrich & Kräusslich, 2001). La sérine/thréonine kinase *MLK3* (*Mixed lineage kinase 3*) a induit la plus forte augmentation de l'expression du rapporteur avec une augmentation de 8,8 fois. Le rôle proviral de *MLK3* dans l'infection par le HIV a ensuite été validée *in vitro* à l'aide de mutants et par des expériences de perte de fonction (Nguyen *et al.*, 2007).

Enfin, le maraviroc, seule molécule indiquée dans le traitement d'une infection par le HIV ciblant une protéine de l'hôte, a été identifiée grâce à un double criblage. Le premier criblage a eu pour but d'identifier un ligand de CCR5 à l'aide d'une banque de petites molécules. Une molécule de la famille des imidazopyrimidines a été identifiée et son pouvoir antiviral a été validé. Par la suite, près de 1000 analogues de cette molécule ont été testés afin d'augmenter le pouvoir antiviral, d'améliorer la stabilité et l'absorption ainsi que les

paramètres pharmacocinétiques. Ce criblage a permis d'identifier le maraviroc qui a ensuite été validé sur plus de 200 souches virales différentes (Dorr *et al.*, 2005). Deux essais cliniques de phase 3 ont été complétés en avril 2007 (Identifiants : NCT00098293 et NCT00098306) suivis d'une acceptation de mise sur le marché dans plusieurs pays, dont la France, fin 2007.

3. Les criblages sur le virus Influenza A

Entre 2008 et 2010, plusieurs criblages de perte de fonction utilisant des siARN ont été réalisés sur différents modèles d'étude des infections par IAV. Le premier a d'abord été réalisé sur des cellules de *Drosophila* puis les meilleurs candidats ont ensuite été validés en cellules HEK 293 (Hao *et al.*, 2008). Trois autres criblages ont été réalisés impliquant un cycle unique ou des cycles multiples d'infection par IAV permettant d'identifier des facteurs d'hôte potentiellement impliqués dans les étapes précoces ou tardives du cycle viral (Brass *et al.*, 2009; Karlas *et al.*, 2010; König *et al.*, 2010). Un dernier criblage fonctionnel a été réalisé en ciblant des gènes identifiés comme interagissant avec une ou plusieurs protéines virales par double-hybride en levure ou par étude du transcriptome de cellules primaires de l'épithélium bronchial infectées par IAV (Shapira *et al.*, 2009). Différentes méta-analyses ont été réalisées afin de recouper les résultats de ces différents criblages (Mehle & Doudna, 2010; Min & Subbarao, 2010; Stertz & Shaw, 2011; Watanabe *et al.*, 2010). Les différents criblages ont permis d'identifier 1452 gènes potentiellement impliqués dans l'infection par IAV. Cependant, seulement 128 gènes, soit 8,8 % des gènes identifiés, sont retrouvés dans au moins 2 criblages. De plus, les trois criblages ciblant le génome complet n'ont identifié que 4 gènes communs, à savoir, la v-ATPase AT6AP1 et les protéines ARCN1, γ -COP et β' -COP impliquées dans le transport de vésicule COPI (Brass *et al.*, 2009; Karlas *et al.*, 2010; König *et al.*, 2010). Le peu de recoupement entre les différents criblages est expliqué par les différents modèles cellulaires et viraux utilisés ainsi que les différentes conditions expérimentales appliquées.

Jusqu'à récemment, les deux traitements disponibles contre l'IAV ciblaient les protéines virales M2, qui forme les canaux ioniques, ou NA, la neuraminidase (Davies *et al.*, 1964; Hayden, 2001). Cependant, l'IAV pouvant muter rapidement, des virus émergents résistants aux traitements ont été observés ces dernières années (Bright *et al.*, 2005; Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team *et al.*, 2009). Depuis, le Xofluza, un inhibiteur de l'endonucléase, a été approuvé mais il conduit aux mêmes problèmes d'émergence de résistances que les deux autres traitements (Hayden *et al.*, 2018; Takashita

et al., 2018). Afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, une expression ectopique des différentes protéines du IAV suivie d'une co-immunoprécipitation a permis d'identifier 1292 protéines cellulaires interagissant avec une protéine virale. La validation fonctionnelle des protéines cellulaires par perte de fonction a mis en évidence 299 facteurs d'hôte potentiellement impliqués dans l'infection par IAV. Par la suite, le criblage de petites molécules ciblant les facteurs d'hôtes a identifié 11 molécules ayant un pouvoir antiviral, dont des molécules ciblant JAK1 (Watanabe *et al.*, 2014).

Deux criblages ont utilisé la technologie CRISPR-Cas9 afin d'éteindre l'expression de gènes ciblés dans tout le génome (Han *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2020). Le premier criblage a identifié différents gènes impliqués dans la biosynthèse de l'acide sialique, dont *SLC35A1*, comme étant nécessaires à l'expression du récepteur du IAV et donc de l'entrée virale. Le criblage a également révélé le rôle de la protéine CIC dans la répression de l'expression de gènes de l'immunité innée (Han *et al.*, 2018). La seconde étude a couplé un criblage perte de fonction ciblant tout le génome à une méta-analyse combinant systématiquement les résultats obtenus aux connaissances déjà acquises sur les facteurs d'hôte potentiels du IAV. Les facteurs d'hôte *WDR7* (*WD repeat domain 7*), *CCDC115* (*Coiled-coil domain containing 115*) et *TMEM199* (*Transmembrane protein 199*) ont été validés comme essentiels pour l'entrée virale et l'assemblage des ATPases de type V, ainsi que la méthyltransférase *CMTR1* (*Cap methyltransferase 1*) nécessaire au « vol de la coiffe » (*cap snatching* en anglais) par le virus ainsi que la régulation de la réponse immunitaire cellulaire (Li *et al.*, 2020). L'identification des différents facteurs d'hôte est importante et pourrait permettre le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant ces facteurs et ayant une fréquence d'apparition de souches virales résistantes beaucoup plus faible.

4. Les criblages sur le virus de la Dengue

Le DENV fait partie de la famille des Flavivirus comprenant d'autres virus pathogènes humains tels que le *yellow fever virus* (YFV), le *West Nile virus* (WNV) et le virus Zika (ZIKV) (pour une revue voir Holbrook, 2017). Chaque année, 390 millions de personnes sont infectées par le DENV dont 96 millions développent des cas de dengue et il n'existe actuellement aucun traitement contre l'infection par le DENV et aucun vaccin permettant de prévenir efficacement l'infection par ce virus (Bhatt *et al.*, 2013; Capeding *et al.*, 2014). Afin d'identifier les facteurs d'hôte impliqués dans l'infection par le DENV, et potentiellement dans l'infection

par d'autres Flavivirus, plusieurs criblages de perte de fonction ont été réalisés ces 5 dernières années. Un criblage utilisant une banque de siARN ciblant tout le génome humain a été réalisé sur des cellules Huh7 par la suite infectées par le DENV. Les facteurs d'hôtes potentiels identifiés ont été comparés à ceux identifiés lors d'une infection par le YFV. L'étude a identifié 68 gènes retrouvés dans les 2 criblages. Parmi ces gènes, les protéines EMC2 (*ER membrane protein complex subunit 2*) et EMC3 (*ER membrane protein complex subunit 3*), faisant partie de l'EMC (*ER membrane protein complex*) et impliquées dans le métabolisme lipidique et la synthèse protéique associés au RE, ont été identifiées. Des études chez le moustique ont montré que l'EMC joue un rôle avant ou lors du désassemblage de la capsid et dans la biogenèse des protéines virales (Barrows *et al.*, 2019).

Une autre étude a établi l'interactome de NS1 par co-immunoprécipitation et spectrométrie de masse puis a révélé les facteurs d'hôte potentiels par perte de fonction parmi les protéines identifiées. Les protéines RACK1 et CCT (*Chaperonin TRiC*) ainsi que le complexe oligosaccharyltransférases (OST) ont été identifiées comme jouant un rôle dans la réplication du DENV. L'étude fonctionnelle a montré que le complexe OST induit la glycosylation de NS1 et NS4B nécessaires à l'infection virale et que l'inhibition pharmacologique de la fonction de ce complexe diminue fortement l'infection par le DENV (Hafirassou *et al.*, 2017). Le rôle du complexe OST dans la réplication virale a également été identifié dans deux criblages par perte de fonction utilisant la technologie CRISPR-Cas9 (Lin *et al.*, 2017; Marceau *et al.*, 2016). Enfin, une étude de criblage par perte de fonction sur les infections par le DENV et le ZIKV a montré que les deux virus nécessitent l'EMC lors des étapes précoces de leur cycle viral et que l'EMC interagit avec le complexe OST également impliqué dans la réplication virale (Savidis *et al.*, 2016).

Un criblage par KO a été réalisé à l'aide d'une banque de lentivirus exprimant des sgARN ciblant plus de 19.000 gènes utilisée pour transduire la lignée haploïde HAP1. Le criblage ainsi que des validations par KO en cellules 293T ont mis en évidence le rôle du complexe dolichol-phosphate mannose synthase (DPMS), et plus particulièrement des sous-unités DPM1 et 3 de ce complexe, en tant que facteur d'hôte du DENV et du ZIKV. Ce complexe est impliqué dans la modification post-traductionnelle des protéines dans la lumière du RE, dont la N-glycosylation et la C- ou O-mannosylation. L'activité catalytique de ce complexe est nécessaire à la réplication du génome viral ainsi qu'à la glycosylation des protéines virales prM et E (Labeau *et al.*, 2020).

Il y a une dizaine d'années, un criblage de petites molécules a été réalisé afin d'identifier de nouveaux inhibiteurs de l'infection par DENV. La banque contient 5632 molécules dont le mécanisme d'action est identifié et dont certaines sont déjà approuvées par la FDA (*Food and Drug Administration*) et a été utilisée sur des cellules HEK 293T infectées par le DENV. Le criblage a permis d'identifier 73 molécules inhibant l'infection par le DENV de plus de 80 % avec une toxicité inférieure à 20 %. Le mode d'action et la cible d'environ la moitié des molécules sont connus et contiennent notamment des transporteurs, des récepteurs ou des kinases (Shum *et al.*, 2010). Depuis, plusieurs études ont été réalisées, en criblage ou non, afin d'évaluer le potentiel *in vitro* de différentes molécules ciblant principalement les protéines virales. Cependant, bien que certaines molécules aient accédé au stade d'essai clinique, aucune d'entre elles n'a montré de réelle efficacité et tous les essais cliniques ont été arrêtés (Boldescu *et al.*, 2017).

5. Les criblages HCV

Les thérapies actuellement utilisées contre le HCV ciblent les protéines virales. Leur efficacité à éliminer le virus dans plus de 90 % des cas a diminué la nécessité de développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Cependant, l'apparition de résistances aux traitements actuels pourrait au final induire une sélection de la population virale résistante et limiter leur efficacité (Crouchet *et al.*, 2018). La découverte de facteurs d'hôte est importante afin de découvrir de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant les protéines de l'hôte. Ces traitements présentent l'avantage d'induire moins de résistance mais peuvent être responsables d'un plus grand nombre d'effets secondaires si le facteur d'hôte ciblé est exprimé de façon ubiquitaire.

L'étude des interactions entre le HCV et son hôte a longtemps été limitée par le manque d'un modèle d'étude robuste et simple d'utilisation. Le développement de système permettant la réplication et la production de virus *in vitro* il y a une quinzaine d'années a révolutionné le monde scientifique du HCV et permis l'étude extensive des différentes étapes du cycle viral ainsi que l'étude de l'effet inhibiteur de petites molécules (Wakita *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005). Depuis, de nombreux criblages ont été réalisés permettant de mieux comprendre les étapes du cycle viral ainsi que le rôle des protéines cellulaires associées.

L'étape d'entrée du HCV est complexe et plusieurs protéines impliquées dans cette étape ont été identifiées par criblage. Une banque d'ADNc dérivée des cellules Huh7.5

permissives au HCV a été clonée dans un vecteur permettant la production de lentivirus. Des cellules 293T exprimant les facteurs d'entrée CD81 et SR-BI ont été transduites avec les lentivirus puis infectées avec des pseudoparticules HCV (HCVpp). Cette étude a permis la découverte de CLDN1 comme étant impliquée dans une étape tardive de l'entrée du HCV (Evans *et al.*, 2007). La même étude a été réalisée sur une lignée de fibroblastes embryonnaires de souris NIH3T3, surexprimant les protéines humaines CD81, SR-BI et CLDN1, et a mené à la découverte du facteur d'hôte OCLN dans l'entrée du HCV (Ploss *et al.*, 2009). En plus de ces études de gain-de-fonction, des études utilisant des banques de siARN ciblant tout ou une partie du génome ont été réalisées. Un criblage de perte-de-fonction ciblant les kinases a mis en évidence l'implication d'EGFR et de EphA2 (*Ephrin receptor A2*) dans l'entrée virale (Lupberger *et al.*, 2011). L'étude fonctionnelle a montré que ces kinases régulent l'interaction entre CD81 et CLDN1 et que EGFR est endocyté suite à l'infection de manière dépendante de CD81 (Diao *et al.*, 2012; Lupberger *et al.*, 2011). Un criblage de perte-de-fonction ciblant tout le génome a également identifié différents facteurs d'hôte impliqués dans l'entrée virale tels que l'E-cadhérine CDH1, la choline kinase CHKA ou encore la protéine SMAD6 (Li *et al.*, 2014).

Le génome du HCV contient des sites de liaison au miR-122 dans la région 5' UTR. L'interaction de miR-122 avec le génome viral est nécessaire à sa stabilité et à la réplication virale (Jopling *et al.*, 2005, 2008; Schult *et al.*, 2018). Un criblage de siARN ciblant 62 protéines cellulaires décrites comme interagissant avec le génome ou des protéines virales ou appartenant à des voies de signalisation potentiellement impliquées dans l'infection par le HCV a identifié 26 facteurs d'hôte diminuant la production de particules virales de plus de 3 fois (Randall *et al.*, 2007). Parmi ces protéines est retrouvé Dicer, majoritairement impliqué dans la voie de biosynthèse des miR, dont miR-122. Les miR sont impliqués dans la régulation de l'expression d'un grand nombre de gènes cellulaires et les infections virales sont connues pour largement perturber l'expression des miR (Bandiera *et al.*, 2016; Bruscella *et al.*, 2017). Afin d'identifier de nouveaux facteurs d'hôtes et les miR impliqués dans la régulation de leur expression, un criblage par transfection de plus de 2000 miR a récemment été réalisé. Les cellules ont ensuite été infectées par HCV afin de mesurer l'impact des miR sur la réplication virale et sur l'infectivité des virions produits. Le criblage a mis en évidence les miR-501-3p et miR-619-3p ainsi que leur cible OGT (*O-linked N-acetylglucosamine transferase*) comme étant

des facteurs d'hôte impliqués dans l'assemblage du HCV et dans l'infectivité des virions produits (Herzog *et al.*, 2020).

6. Les criblages HBV/HDV

A l'instar du HCV, les recherches sur les interactions entre le HBV et son hôte ont longtemps souffert d'un manque de modèle d'étude simple récapitulant le cycle viral complet. En 2012, un criblage protéique a permis d'identifier le récepteur du HBV. Différents peptides Prés1 ont été synthétisés et mis en contact d'hépatocytes primaires du Toupaye de Belanger, l'un des hôtes du HBV, afin de servir d'appât. Les complexes Prés1-protéine ont été fixés par réticulation UV puis purifiés et analysés par spectrométrie de masse, permettant l'identification de NTCP comme protéine membranaire interagissant avec Prés1 (Yan *et al.*, 2012). Les validations de NTCP comme récepteur fonctionnel du HBV ont mené au développement de modèles d'études d'infection simple d'utilisation par la production de lignées dérivées d'hépatocarcinome humain (Huh7 ou HepG2 par exemple) surexprimant NTCP et sensibles à l'infection par le HBV (Verrier *et al.*, 2016b). Le HDV est enveloppé par les glycoprotéines d'enveloppe AgHBs du HBV et emprunte donc la même voie d'entrée que le HBV lors de l'infection. De ce fait, le HDV peut servir de modèle d'étude de l'entrée du HBV. Un criblage utilisant des siARN ciblant 12 protéines faisant partie de la famille des HSPG a été réalisé sur un modèle d'infection par le HDV de cellules Huh7 surexprimant NTCP (Huh106). Les résultats du criblage ainsi que les validations subséquentes ont permis de valider le rôle de GPC5 (Glypican 5) dans l'entrée du HBV et du HDV (Verrier *et al.*, 2016a).

Les criblages réalisés sur les différents modèles mis en place ont principalement été des criblages de petites molécules permettant d'inhiber l'entrée ou la morphogénèse du HBV. Parmi eux, deux criblages ont mis en évidence le pouvoir antiviral des oxystéroïdes, dont les cyclosporines A et B, ainsi que de la Vanitaracin A, un polycétide tricyclique, par inhibition de l'entrée du HBV et du HDV (Iwamoto *et al.*, 2014; Kaneko *et al.*, 2015). La lignée HepAD38 est une lignée reporthrice produisant une grande quantité d'ADNccc du HBV et de particules virales infectieuses (Ladner *et al.*, 1997). Le criblage de 10.000 petites molécules a permis la découverte de deux molécules accélérant la formation de la nucléocapside du HBV et appelés modulateurs de l'assemblage de la capsid (CAM – *capsid assembly modulator*). Les CAM induisent une formation accélérée de la nucléocapside menant à une diminution de la

sécrétion de particules infectieuses ainsi qu'une diminution du recyclage de l'ADNcr et donc une baisse de la quantité d'ADNccc (Pei *et al.*, 2019).

Tous les modèles cellulaires n'ont pas une permissivité équivalente au HBV. Plus particulièrement, les cellules HepG2-NTCP répliquent le HBV de manière beaucoup plus efficace que les cellules Huh106. L'idée qu'un ou plusieurs facteurs d'hôte manquant dans les cellules Huh106 pourrait empêcher une réplication efficace du HBV, un criblage utilisant une banque de lentivirus codant plus de 16.000 ORF a été réalisé. Les cellules Huh106 ont été transduites avec les lentivirus puis infectées par le HBV. L'isolement des cellules permissives au HBV a permis d'identifier 47 ORF dont l'expression induit une augmentation de la permissivité des cellules Huh106 au HBV. Des expériences de validation ont identifié CDKN2C (*Cyclin dependent kinase inhibitor 2C*) et son rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 comme facteur d'hôte impliqué dans l'infection du HBV (Eller *et al.*, 2020).

Objectifs de la thèse

Objectifs de la thèse

Les virus hépatiques chroniques (HCV, HBV et HDV) sont responsables de la grande majorité des maladies hépatiques et des carcinomes hépatocellulaires dans le monde. Ils constituent de ce fait un problème de santé publique majeur. Mon laboratoire d'accueil a, depuis plusieurs années, développé différentes stratégies de criblage de perte- et gain-de-fonction afin de découvrir de nouveaux facteurs d'hôte du HCV, du HBV et du HDV pouvant mener à la découverte de nouveaux HTA. Mes différents travaux de thèse ont porté sur l'exploitation des résultats de ces différents criblages dans l'étude du HCV d'une part, et du HDV et du HBV d'autre part.

HTA /HCV

L'absence de vaccin permettant de prévenir une infection par le HCV et les défis accompagnant la recherche vaccinale ont conduit à la nécessité de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Depuis quelques années, la mise sur le marché de traitements antiviraux directs (DAA – *direct-acting antiviral*) éliminant efficacement le virus a redonné espoir aux patients infectés par ce virus dont les solutions thérapeutiques étaient jusqu'alors très largement insatisfaisantes (Baumert *et al.*, 2019). Cependant, le coût des traitements DAA est très élevé et de ce fait leur disponibilité est réduite. De plus, les cibles de ces traitements étant des protéines virales et le HCV ayant un taux de mutation élevé, plusieurs cas de résistances ont déjà été observés (Awady & Dawood, 2017). Afin de diminuer le risque de résistance, les HTA (*host-targeting agent*) constituent une solution de choix car ils ciblent un facteur d'hôte nécessaire au virus (Crouchet *et al.*, 2018). De plus, des virus d'une même famille pouvant dépendre d'un même facteur d'hôte, l'identification d'une telle molécule pourrait permettre de traiter plusieurs infections virales. Cependant, la découverte d'un HTA nécessite une connaissance approfondie des interactions entre le virus et son hôte. Le HCV dépend très largement de son hôte, l'hépatocyte, et l'infection chronique par le HCV nécessite l'établissement d'une balance entre réplication virale, métabolisme hépatique et réponse immunitaire. De ce fait, l'un des axes de recherche de notre unité de recherche est l'étude des interactions entre le HCV et son hôte.

RACK1 est une protéine multifonctionnelle trouvée sous forme libre dans le cytoplasme ou liée à la petite sous-unité ribosomique. En 2014, notre laboratoire a participé très activement à la validation d'un criblage par perte-de-fonction ciblant des protéines ribosomiques qui a permis d'identifier le rôle de la forme ribosomique de RACK1 dans la

Objectifs de la thèse

traduction IRES-dépendante du HCV (Majzoub *et al.*, 2014). Sous cette forme, RACK1 joue également un rôle dans la spécialisation du ribosome favorisant la traduction de certains ARNm ainsi que la croissance et la chimiorésistance du carcinome hépatocellulaire (Ruan *et al.*, 2012). Sous sa forme libre, RACK1 régule un très grand nombre de voies de signalisation cellulaires dont de multiples voies de l'immunité innée et de l'inflammation (Adams *et al.*, 2011). Notre hypothèse a été que lors d'une infection par le HCV, le virus pourrait relocaliser RACK1 au ribosome et le détourner de ses fonctions régulatrices afin de subvenir à la traduction virale. Ce détournement pourrait alors induire des perturbations de la régulation des différentes voies de l'immunité innée et de l'inflammation dans lesquelles RACK1 est impliquée. Le premier but de mes travaux de thèse a été d'estimer l'impact du détournement de RACK1 sur l'inflammation hépatique en mimant ce détournement par déplétion de RACK1 dans des cellules hépatiques.

Dans un deuxième temps, mon objectif a été d'établir un mutant de RACK1 ne pouvant plus se lier au ribosome comme décrit par Ruan *et al.* en 2012. La forme ribosomique de RACK1 étant nécessaire à la traduction du HCV, j'ai voulu mettre en place un modèle d'étude dans lequel l'expression endogène de RACK1 est supprimée par KO et est complétée par l'expression exogène des versions sauvage et mutante de RACK1 par vecteur lentiviral. Le but de ce modèle était de pouvoir par la suite étudier l'effet d'une déplétion ribosomique de RACK1 sur la physiologie hépatique mais également de servir de modèle dans l'étude de molécules ciblant l'interaction entre RACK1 et le ribosome. La découverte d'une telle molécule pourrait permettre le développement d'un traitement pouvant être utilisé contre les infections virales, humaines et animales, nécessitant RACK1 pour leur traduction IRES-dépendante. La forme ribosomique de RACK1 étant également impliquée dans la croissance cellulaire du CHC (Ruan *et al.*, 2012), ce traitement pourrait aussi être utilisé comme traitement anticancéreux chez les patients atteints de CHC.

HTA/HDV/HBV

L'hépatite D, causée par une co-infection du HDV avec le HBV, est la forme d'hépatite virale la plus sévère. La majorité des patients infectés par le HDV sont traités avec du PEG-IFN- α qui n'induit une élimination complète du virus que dans une minorité de cas et est responsable d'effets secondaires graves. De ce fait, les traitements actuels sont largement insatisfaisants et de nouvelles stratégies thérapeutiques sont nécessaires. Le HDV ne code

Objectifs de la thèse

qu'une seule protéine, exprimée sous deux formes, ne possédant aucune fonction enzymatique. Le développement de DAA, ciblant des fonctions enzymatiques de protéines virales, est donc impossible. Quelques étapes clés du cycle viral, comme la farnésylation de L-HDAg, sont connues et ont mené au développement de molécules antivirales, telles que le lonafarnib ou REP-2139, actuellement évaluées en essai clinique (Bazinet *et al.*, 2019; Koh *et al.*, 2019). Cependant, le cycle viral et les facteurs d'hôte nécessaires sont encore largement méconnus. De ce fait, l'étude des interactions virus-hôte est nécessaire afin d'identifier de nouveaux facteurs d'hôte pouvant servir de cible thérapeutique dans le développement de nouveaux traitements contre le HDV. Notre institut de recherche est spécialisé dans l'étude des interactions entre les virus hépatiques chroniques et leur hôte. L'expertise dans ce domaine provient à la fois de la mise en place (Verrier *et al.*, 2016a) ou de la maîtrise d'un grand nombre de modèles d'études (culture cellulaire, sphéroïdes, modèles animaux), ainsi que la réalisation de nombreux criblages sur le HCV (Bandiera *et al.*, 2016; Herzog *et al.*, 2020; Lupberger *et al.*, 2011) et sur le HBV (Eller *et al.*, 2020; Verrier *et al.*, 2016a). La maîtrise des modèles d'études de l'infection par le HDV et des criblages a permis au laboratoire de développer un projet d'étude des interactions entre le HDV et son hôte par un criblage de perte-de-fonction et un criblage pharmacologique. Durant la deuxième partie de mon doctorat, en raison des difficultés rencontrées dans l'avancée du projet RACK1, j'ai rejoint le groupe du Dr. Verrier qui avait déjà réalisé les criblages par perte-de-fonction et pharmacologique sur un modèle d'infection par le HDV. J'ai d'abord participé à la validation d'un candidat du criblage de perte-de-fonction et à sa caractérisation comme facteur d'hôte du HDV. Ces résultats ont permis de valider l'approche du criblage dans la découverte de nouveaux facteurs d'hôte du HDV. Dans ce projet, le but de mes recherches a été d'exploiter les résultats des deux criblages afin de découvrir de nouveaux facteurs d'hôte du HDV puis de valider leur rôle fonctionnel dans l'infection.

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

Réactifs utilisés

siARN

Les siARN utilisés sont un ARN contrôle siCTRL (Ambion), siRACK1 (Fisher), siP65 (Ambion), siJUN (Ambion), siIRF3 (Ambion) et siCAD (Ambion). Les siARN ciblant les différentes protéines SLC utilisés lors du mini-criblage proviennent de chez Ambion.

Anticorps

Les anticorps primaires utilisés en western blot sont les anticorps anti-RACK1 (SantaCruz Biotechnology, sc-17754), anti-c-Jun (Abcam, ab105186), anti-P-c-Jun (Abcam, ab32385), anti- β -tubuline (GeneTEch, GTX101279) anti-p-STAT1 (Cell Signaling Technology, 9167), anti-p65 (Abcam, ab16502), anti-histone H3 (Abcam, ab18521), anti-actine (Sigma-Aldrich, A5441), anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich, F3165), anti-SLC22A5 (Abcam, ref ab125416) et anti-SLC2A2 (Abcam, ref 192599). Les anticorps secondaires utilisés sont les anticorps anti-souris (GE Healthcare, ref NA931) et anti-lapin (Jackson, ref 111-035-144) couplés à la HRP (*horseradish peroxidase*).

Traitements cellulaires

Les traitements cellulaires sont réalisés en présence d'IFN- γ (Clinisciences), de tunicamycine (Sigma-Aldrich), de *free fatty acids* (FFA) (Sigma-Aldrich), d'erlotinib (Selleckchem), de TNF- α (R&D Systems), de carnitine (Selleckchem), d'acide DL-dihydroorotique (Sigma-Aldrich), de L-glutamine (Sigma-Aldrich) ou d'acide sparfosique ou PALA (synthétisé par l'Institut de Chimie de l'Université de Strasbourg). Les concentrations et les temps de traitement sont précisés dans la section résultat et dans les légendes des figures.

Lignées cellulaires et culture

Les cellules Huh7 et Huh7.5.1 dérivées d'hépatocarcinome humain sont cultivées dans du milieu *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose* (GE Healthcare) additionné de 10 % sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté et de 0,5 % (v/v) gentamycine. Les cellules Huh7.5.1 sont différenciées par ajout de 1 % (v/v) de DMSO (diméthylsulfoxyde) à leur milieu de culture pendant une semaine. Les cellules Huh106, Huh7-NTCP et HepG2-NTCP dérivées d'hépatocarcinome humain sont cultivées dans du milieu *DMEM High Glucose* (GE Healthcare) additionné de 10 % SVF décomplémenté, de gentamycine et de néomycine

Matériel et méthodes

(250 µg/ml). Les cellules 293T dérivées de rein embryonnaire humain sont cultivées dans du milieu DMEM (GE Healthcare) additionné de 10 % SVF décomplémenté et de gentamycine. Les hépatocytes primaires humains sont cultivés dans du milieu Williams' E sans sérum additionné de 1 % (v/v) PenStrep (Gibco). Toutes les cellules sont cultivées à 37°C sous atmosphère humide à 5 % CO₂.

Rétro-transfection de siARN

Les rétro-transfections sont réalisées en plaque 48 puits. Un mix est réalisé contenant (pour un puits) 50 µl d'OptiMEM (GE Healthcare), 0,5 µl de Lipofectamine RNAiMax (ThermoFisher) et 0,25 µl de siARN à 20 µM. Le mix est incubé 5 min à température ambiante puis 50 µl sont déposés au fond d'un puits. Les cellules Huh7 et Huh7.5.1 sontensemencées à une concentration de $3,0 \cdot 10^4$ cellules/puits. Les cellules HepG2 sontensemencées à une concentration de $6,0 \cdot 10^4$ cellules/puits. Les PHH sontensemencés à une concentration de $1,0 \cdot 10^5$ cellules/puits. Après 6 h, le milieu est remplacé puis les cellules sont cultivées pendant 72 h.

Analyse de l'expression d'ARN par rétro-transcription et RT-qPCR

Les ARN totaux sont extraits à l'aide du kit *ReliaPrep RNA cell Miniprep System* (Promega) puis rétro-transcrits en ADNc grâce au kit *Maxima RT* (Thermo Fisher). La réaction de rétro-transcription est réalisée par le thermocycleur T100 Thermal Cycler (BioRad) selon les conditions suivantes : 25°C pendant 10 min, 50°C pendant 20 min, 85°C pendant 5 min puis les échantillons sont gardés à 4°C. La réaction de RT-qPCR est réalisée en présence de réactifs TaqMan comprenant les amorces permettant l'amplification du gène cible et une sonde spécifique du gène qui est dégradée lors de l'amplification induisant la libération d'un fluorochrome. La réaction d'amplification ainsi que la détection de la fluorescence, corrélée à la quantité d'ADNc, sont réalisées par le thermocycleur QuantStudio 3 (ThermoFisher). Lors de la qRT-PCR, les échantillons sont d'abord chauffés à 95°C pendant 10 min, puis 45 cycles sont répétés selon le modèle : 95°C pendant 15 sec puis 60°C pendant 60 sec. La quantification de l'ADNc de la GAPDH est utilisée comme référence. IP-10, p65, c-Jun, et IRF3 sont détectées à l'aide d'amorces et d'une sonde TaqMan (Applied Biosystems).

Traitement de cellules Huh7 naïves avec un surnageant siRACK1

Matériel et méthodes

Les surnageants provenant de cellules Huh7 naïves ou rétro-transfectées avec siCTRL ou siRACK1 sont récoltés 24 h, 48 h, 72h et 96 h après transfection. Des cellules Huh7 naïves sont ensemencées dans une plaque 48 puits à la concentration 3.10^4 cellules/puits. Après 24h, le milieu de culture est remplacé par les différents surnageants récoltés. Les cellules sont lysées après 24 h et l'expression d'IP-10 est analysée par RT-qPCR.

Analyse de l'expression protéique par Western blot

Les cellules sont rincées avec du PBS puis lysées à 4°C dans le tampon *Lysis Buffer 17* (BRAN) additionné d'inhibiteurs de protéases et d'inhibiteurs de phosphatases (tablettes cOmplete et PhosSTOP, Roche). Les lysats sont centrifugés 5 min à 13 000 rpm et les surnageants contenant les protéines sont récoltés. La concentration protéique est mesurée à l'aide du kit *BCA protein assay* (Pierce Biochemicals). Entre 10 et 20 µg de protéines sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) puis transférées sur une membrane PVDF (polyfluorure de vinylidène – BioRad) à l'aide d'un Trans-Blot Turbo Transfert (BioRad). Les membranes sont incubées avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS (*Phosphate buffer saline*)-Tween 0,1 % ou du TBS (*Tris buffer saline*)-Tween 0,1% pour les anticorps anti-p-c-Jun et anti-p-STAT1. Les membranes sont ensuite lavées puis incubées avec un anticorps secondaire. La réaction de luminescence est activée à l'aide d'ECL Clarity (BioRad) et imagée à l'aide du système ChemiDoc (BioRad).

Fractionnement subcellulaire

Le tampon de fractionnement subcellulaire est composé de 20 mM HEPES pH 7,4, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA et 1 mM DTT. Les cellules sont lysées dans 100 µl de tampon de fractionnement subcellulaire et incubées 15 min sur glace. Les lysats sont passés 10 fois à la seringue montée d'une aiguille 27G puis incubées 20 min sur glace. Ils sont centrifugés 5 min à 3000 rpm et le surnageant contenant la fraction cytoplasmique est récolté. Les culots sont resuspendus dans 100 µl de tapon de fractionnement par 10 passages dans une seringue montée d'une aiguille 25G puis centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min. Les surnageants sont éliminés et les culots contenant la fraction nucléaire sont resuspendus dans 40 µl de TBS avec 0,1 % de SDS et l'ADN est découpé à l'aide d'un sonicateur.

Détection d'IP-10 par ELISA

Matériel et méthodes

La détection d'IP-10 par ELISA est réalisée à l'aide du kit *Human IP-10 ELISA Kit* (Abcam, ab100579) selon les recommandations du fabricant. L'analyse finale est réalisée à l'aide du spectrophotomètre *Vmax kinetic microplate reader* (Molecular Devices).

Transfection de l'ARN HCV JcR2A par électroporation

Les différentes lignées de cellule Huh7.5.1 produites par transduction sont détachées par incubation dans de la trypsine-EDTA (0,05 % ; Gibco) et reprise dans 20 ml de milieu de culture. Elles sont comptées puis centrifugées pendant 5 min à 500 g. Le culot est repris dans 10 ml de DPBS (-) (*Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (-)*, Gibco) à 4°C et les amas cellulaires sont éliminés par filtration (Falcon 40 µm *Cell strainer*, Corning). Les cellules sont centrifugées 5 min à 500 g puis reprises dans du DPBS (-) à 4°C à une concentration de 2.10^7 cellules/ml. Dans la cuvette d'électroporation les cellules sont soumises à 5 pulses de 99 µsec à 820 V séparés d'un intervalle de 1 sec à l'aide de l'électroporateur ECM 830 (BTX, Harvard apparatus) puis incubées 10 min à température ambiante. La suspension est reprise dans 12,5 ml de milieu de culture Huh7.5.1 et ensemencée dans une plaque 12 puits à raison de 1 ml par puits. Après 4 h, le milieu de culture est renouvelé afin d'éliminer les cellules mortes. Après 48 h, les cellules sont lysées dans 150 µl de *Glo Lysis Buffer* (Promega) et la répllication du HCV est mesurée par détection de l'activité luciférase Renilla à l'aide du kit *Renilla Luciferase Assay* (Promega).

Infection de cellules Huh7.5.1^{dif} avec HCV

Les particules virales HCVcc Jc1 (génotype 2a) ont été produites en cellules Huh7.5.1 comme décrit précédemment (Pietschmann *et al.*, 2006). L'infectivité des HCVcc produits a été mesurée par la TCID₅₀ (*Median tissue culture infectious dose*). Les cellules Huh7.5.1^{dif} ont été infectées par HCVcc pendant 10 jours. L'infection par HCV est vérifiée par RT-qPCR.

Détection de l'épissage de l'ARNm XBP1 par RT-PCR

Les ARN totaux sont extraits puis rétro-transcrits. L'ADNc de *XBP1* est ensuite amplifié par PCR à l'aide des sondes sens (CTGGAACAGCAAGTGGTAGA) et antisens (CTGGGTCCTTCTGGGTAGAC) permettant la détection des formes épissées et non-épissées de *XBP1*. La PCR est réalisée par le thermocycleur T100 Thermal Cycler (BioRad) par la polymérase Phusion (NEB) pendant 35 cycles de : 95°C pendant 15 sec puis 60°C pendant 60 sec. La

Matériel et méthodes

réaction de PCR est ensuite déposée sur un gel d'agarose 1 % et les ADN sont ensuite séparés par électrophorèse en présence de tampon TAE, préparé à l'aide de TAE 10x (Invitrogen). Le gel est ensuite imagé à l'aide du système ChemiDoc (BioRad).

Détection des lipides neutres par fluorescence

Les cellules sont fixées dans du PBS supplémenté de 4 % de paraformaldéhyde pendant 20 min à température ambiante. Elles sont ensuite lavées deux fois au PBS puis incubées pendant 30 min dans un tampon de saturation composé de PBS ajouté de 0,5 % (p/v) de BSA (*Bovine serum albumine*) et de 0,05 % (p/v) de Saponine (Sigma-Aldrich) afin de saturer les sites aspécifiques. Le marquage des lipides neutres est réalisé par incubation des cellules avec du Bodipy 493/503 (ThermoFisher, D3922) dilué dans le tampon de saturation pendant 90 minutes à température ambiante. Les noyaux sont marqués à l'aide de 4',6-diamidino-2-phenylindole. La fluorescence est observée à l'aide d'un microscope Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Allemagne). Un contrôle positif est réalisé par traitement des cellules Huh7 pendant 72 h avec des FFA (*free fatty acid*).

Transcriptomique et *gene set enrichment analysis* (GSEA)

Des cellules Huh7 ont été transfectées avec siCTRL ou siRACK1 puis les ARN totaux ont été extraits comme décrit plus haut. Le profil transcriptomique a été réalisé par séquençage global des ARN par HiSeq 4000 (Illumina) à la plateforme Genomeast de l'IGBMC, Illkirch. L'analyse du transcriptome GSEA a été réalisée sur la plateforme GenePattern (<https://cloud.genepattern.org>) du Broad Institute (MIT, Massachusetts).

Production de lentivirus

Les plasmides permettant la production de lentivirus exprimant Cas9 (pLX_311-Cas9) ou les sgARN (sgEGFP, sgRACK1.1, sgRACK1.2 et sgCAD) proviennent du Broad Institute (MIT, Massachusetts). Les plasmides permettant la production de lentivirus exprimant Cas9 et les sgARN (sgEGFP, sgSLC22A5.1 et sgSLC22A5.2) ont été produits par clonage des séquences des sgARN (**Tableau 1**) dans le plasmide lentiCRISPR v2 par la technique de Gibson (New England Biolabs). Les lentivirus sont produits dans la lignée 293T. Environ 2.10^6 cellules sont ensemencées dans une boîte de Pétri de 10 cm de diamètre. Le lendemain, la co-transfection des plasmides pVSVg, exprimant la glycoprotéine d'enveloppe du VSV (virus de la stomatite

Matériel et méthodes

vésiculaire), psPAX2, permettant l'expression des gènes Gag et Pol du HIV et un des plasmides permettant l'expression de la séquence d'intérêt est réalisée par la technique du phosphate de calcium à l'aide du kit *CalPhos Mammalian Transfection Kit* (Takara). Après 24 h, le milieu est remplacé puis les surnageants contenant les lentivirus sont récoltés 2 et 3 jours post-transfection. Les surnageants sont filtrés à l'aide d'un filtre 0,45 µm puis conservés à -80°C.

Tableau 1 : Séquences des sgARN clonés.

Nom	Séquence
sgEGFP	GGGCGAGGAGCTGTTACCG
sgRACK1.1	CGAGGCGATTTGTGGCCAT
sgRACK1.2	CTCAGAGTGGGTGTCTTGTG
sgCAD	CCACTACCAAGTCTGCTACG
sgSLC22A5.1	TCCAGTCGTCTCACACACC
sgSLC22A5.2	GAATGTGCTGTTCTGACCA

Production de lignées Huh7 et Huh7-NTCP stables par transduction de lentivirus

Afin de produire une lignée Huh7 ou Huh7-NTCP exprimant Cas9 de manière stable puis des lignées KO pour RACK1, CAD et SLC22A5 les lentivirus produits ont été utilisés pour transduire une lignée Huh7. Pour cela, $1,5 \cdot 10^6$ cellules ont étéensemencées dans une flasque F75. Le lendemain, le milieu de culture est remplacé par 8 ml de surnageant contenant les lentivirus. Après 24 h, le milieu est remplacé par du milieu de culture de cellules Huh7. Deux jours plus tard, les cellules sont détachées puisensemencées dans de nouvelles flasques F75 à raison de $1,5 \cdot 10^6$ cellules par flasque. Le milieu de culture est alors additionné de blasticidine (5 µg/ml), d'hygromycine (250 µg/ml) ou de puromycine (1,8 µg/ml) permettant la sélection des cellules transduites avec les lentivirus exprimant Cas9, les sgARN ciblant *RACK1* et *CAD* ou les sgARN ciblant *SLC22A5*, respectivement. Un témoin de sélection constitué de cellules non-transduites est utilisé et la sélection est considérée terminée lorsque les cellules du témoin de sélection sont toutes mortes. Les cellules transduites avec un lentivirus exprimant sgCAD sont également cultivées en présence d'uridine (30 µM).

Afin d'induire la perte d'expression de SLC22A5, une seconde stratégie a également été employée. Les cellules Huh7-NTCP sontensemencées en plaque 96 puits à raison de $1,0 \cdot 10^4$ cellules/puits. Le lendemain, le milieu de culture est remplacé par 100 µL de surnageant contenant les lentivirus. Après 6 heures, le milieu est remplacé par du milieu de

Matériel et méthodes

sélection contenant de la puromycine (0,9 µg/ml) permettant la sélection des cellules transduites. Un témoin de sélection constitué de cellules non-transduites est utilisé et la sélection est considérée terminée lorsque les cellules du témoin de sélection sont toutes mortes.

Production de HDV et infection

Le plasmide HDV recombinant pSVLD3 et le vecteur d'expression du HBV pT7HB2.7 sont utilisés pour la production de la ribonucléoprotéine du HDV et des formes L, M et S de l'antigène de surface du HBV. Les cellules Huh7.5.1 sont transfectées avec les deux plasmides à l'aide de *FuGENE HD Transfection Reagent* (Promega). Les surnageants contenant les particules virales du HDV sont récoltés 9 jours après transfection. Pour l'infection par le HDV, les cellules Huh106 ou Huh7-NTCP sontensemencées dans une plaque 96 puits à raison de $1,0 \cdot 10^4$ cellules/puits et maintenues en culture en absence de DMSO. Les cellules sont infectées par le virus HDV recombinant en présence de 4 % de PEG-8000 (Sigma-Aldrich). Après infection, les cellules sont lavées et incubées dans du milieu William's E avec 2 % de DMSO (Sigma-Aldrich) pendant 7 jours. Après 7 jours, la viabilité cellulaire est mesurée par *PrestoBlue Cell Viability Reagent* (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant. L'infection HBV est détectée par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps ciblant HDAg purifié à partir du sérum d'un patient co-infecté par le HBV et le HDV et un anticorps secondaire marqué à l'Alexa Fluor 647 ciblant l'immunoglobuline G humaine (Jackson Research, dilué 1/200). Les noyaux sont marqués à l'aide de 4',6-diamidino-2-phenylindole. La fluorescence est observée à l'aide d'un microscope Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Allemagne). Les cellules ont également été lysées et les ARN totaux ont été extraits avec le kit *ReliaPrep RNA Miniprep* (Promega). Les ARN totaux ont été rétro-transcrits à l'aide du kit *H Minus First Strand cDNA Synthesis* (Thermo Scientific) puis l'ARNpg du HBV a été quantifié par RT-qPCR à l'aide du thermocycleur QuantStudio 3 (ThermoFisher) ainsi que des amorces et de la sonde suivantes : amorce sens 5'-TGGACGTGCGTCCTCCT-3' ; amorce antisens 5'-TCTTCGGGTCGGCATGG-3' ; sonde TaqMan 5'-[6-fluorescein amidite]-ATGCCAGGTCGGAC-[Black Hole Quencher-1]-3'. Les valeurs ont été normalisées par détection de l'expression de la GAPDH (Applied Biosystems).

Infection par le HBV

Matériel et méthodes

Les cellules HepG2-NTCP ont été infectées par du virus HBV recombinant à 250 GEq par cellule en présence de 4 % de PEG-8000 (Sigma-Aldrich). Après infection, les cellules sont lavées et incubées dans du milieu William's E avec 3,5 % de DMSO (Sigma-Aldrich) pendant 10 jours. Après 10 jours, la viabilité cellulaire est mesurée par PrestoBlue Cell Viability Reagent (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant. L'infection HBV est détectée par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps monoclonal de souris ciblant AgHBs (Bio-Techne, clone 1044/329, dilué 1/100) et un anticorps secondaire marqué à l'Alexa Fluor 647 ciblant l'immunoglobuline G de souris (Jackson Research, dilué 1/200). Les noyaux sont marqués à l'aide de 4',6-diamidino-2-phenylindole. La fluorescence est observée à l'aide d'un microscope Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Allemagne). En parallèle, la sécrétion de AgHBe a été quantifiée par ELISA (Autobio) selon les recommandations du fabricant. Les cellules ont également été lysées et les ARN totaux ont été extraits avec le kit *ReliaPrep RNA Miniprep* (Promega). Les ARN totaux ont été rétro-transcrits à l'aide du kit *H Minus First Strand cDNA Synthesis* (Thermo Scientific) puis l'ARNpg du HBV a été quantifié par RT-qPCR à l'aide du thermocycleur QuantStudio 3 (ThermoFisher) ainsi que des amorces et de la sonde suivantes : amorce sens 5'-GGTCCCCTAGAAGAAGAAGACTCCCT-3' ; amorce antisens 5'-CATTGAGATTCCCGAGATTGAGAT-3' ; sonde TaqMan 5'-[6-fluorescein amidite]-TCTCAATCGCCGCGTCGCAGA-[carboxytetramethylrhodamine]-3'. L'ARN de SLC2A2 a également été détecté par RT-qPCR à l'aide d'amorces et d'une sonde TaqMan (Applied Biosystems) Les valeurs ont été normalisées par détection de l'expression de la GAPDH (Applied Biosystems).

Mini-criblage de siARN ciblant des protéines SLC

Les cellules Huh7-NTCP et HepG2-NTCP ont été rétro-transfectées en plaque 96 puits. Les siARN utilisés sont un *pool* de 4 siARN ON-TARGETplus (Horizon). Le milieu de transfection contient 10 µl d'OptiMEM (Gibco), 0,3 µl de Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) et 0,3 µl de siARN à 10 µM par puits. Après 6h, le milieu est remplacé. Trois jours après transfection, les cellules sont infectées par le HDV pour les cellules Huh7-NTCP et par le HBV pour les cellules HepG2-NTCP.

Validation de SLC22A5 et SLC2A2 par rétro-transfection de siARN

Les cellules Huh7-NTCP et HepG2-NTCP ont été rétro-transfectées en plaque 96 puits. Les siARN utilisés sont un *pool* de 4 siARN ON-TARGETplus, ainsi que les quatre siARN

Matériel et méthodes

individuels ciblant SLC22A5 (Horizon). Le milieu de transfection contient 20 μ l d'OptiMEM (Gibco), 0,2 μ l de Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) et 0,2 μ l de siARN à 10 μ M par puits. Après 6 h, le milieu est remplacé. Trois jours après transfection, les cellules sont infectées par le HDV pour les cellules Huh7-NTCP et par le HBV pour les cellules HepG2-NTCP. L'efficacité de la diminution de l'expression a été suivie par western blot.

Analyse de l'attachement du HDV aux Huh7-NTCP

Des cellules Huh7-NTCP ont été transfectées avec siCTRL ou si22A5. Après 3 jours, les cellules ont été incubées avec du HDV en présence de PEG 4 % pendant 24 h à 16°C. Un contrôle a été réalisé en incubant du HDV prétraité avec de l'héparine (30 μ g/ml) pendant 30 min à 37°C. Les virions libres ont été éliminés par trois lavages successifs au PBS puis les cellules et les virions y étant attachés ont été lysés. Les ARN totaux ont été extraits et l'ARN du HDV a été mesuré par RT-qPCR.

Traitement des cellules Huh7-NTCP avec de la carnitine

Des cellules Huh7-NTCP ont été traitées avec 100 μ M ou 10 mM de carnitine (Selleckchem) pendant 4 h avant d'être infectées par le HDV. Après 16 h d'infection, les cellules ont été cultivées pendant 7 jours en présence ou en absence de carnitine. L'infection par le HDV a ensuite été révélée par immunofluorescence et RT-qPCR.

Résultats

Partie I : Étude du rôle de RACK1 dans la régulation de l'inflammation hépatique lors d'une infection par HCV

I. Introduction

Lors d'une infection chronique par le HCV, une réponse antivirale intracellulaire ainsi qu'une réponse inflammatoire sont mises en place et maintenues par les différents composants du microenvironnement cellulaire hépatique menant à l'inflammation hépatique chronique responsable du développement de la maladie hépatique. La détection du HCV par TLR3 et RIG-I permet l'initiation de la réponse antivirale (Saito *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009) induisant ensuite l'expression et l'activation de différents facteurs de transcription, tels que NF- κ B, c-Jun et IRF3, impliqués dans l'expression de gènes antiviraux et inflammatoires (Li *et al.*, 2012a; Wagoner *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2013). Cependant, les mécanismes permettant de comprendre le maintien de l'état inflammatoire ne sont pas entièrement compris.

En 2014, le laboratoire a décrit le rôle de RACK1 comme facteur d'hôte du HCV nécessaire à la traduction IRES-dépendante du virus (Majzoub *et al.*, 2014). RACK1 est une protéine d'échafaudage ne possédant aucune fonction enzymatique existant sous une forme libre ou associée au ribosome. Sous sa forme libre, elle a été décrite comme impliquée dans la régulation d'un grand nombre de voies de signalisation, dont les différentes voies des réponses antivirales et inflammatoires (détaillées dans l'introduction). En revanche, c'est sous sa forme ribosomale que RACK1 est nécessaire à la traduction IRES-dépendante du HCV (Majzoub *et al.*, 2014).

La forme ribosomique de RACK1 étant nécessaire à l'infection par le HCV, nous avons émis l'hypothèse que l'infection par le HCV pouvait détourner RACK1 de ses fonctions régulatrices de l'inflammation afin de se consacrer à la traduction virale, ceci participerait potentiellement à l'inflammation chronique observée chez les patients. Pour répondre à cette question, nous avons étudié le rôle de RACK1 dans la régulation de l'inflammation hépatique dans un modèle de perte-de-fonction. Nous avons ensuite réalisé une étude transcriptomique de ce modèle afin de comprendre l'impact global de la perte de RACK1 puis de la comparer à des données transcriptomiques obtenues à partir de patients infectés par le HCV (Boldanova *et al.*, 2017). Enfin, nous avons voulu mettre en place un modèle cellulaire exprimant un mutant de RACK1 incapable de se lier au ribosome dans le but de réaliser un criblage de petites molécules pouvant inhiber l'interaction entre RACK1 et le ribosome.

II. Résultats

1. Expression de RACK1, IP-10 et c-Jun chez les patients atteints par le HCV

La protéine RACK1 étant nécessaire à la traduction IRES-dépendante du HCV (Majzoub *et al.*, 2014), j'ai émis l'hypothèse que lors de son infection, le HCV détourne RACK1 de ses fonctions régulatrices. Cet « effet éponge » dû à la séquestration de RACK1 sur le ribosome au détriment de sa présence dans le cytoplasme pourrait, du moins en partie expliquer l'inflammation chronique observée chez les patients infectés chroniquement par le virus.

En 2017, une étude transcriptomique a été réalisée par l'équipe de Markus Heim (HU Basel, Suisse) sur 7 patients atteints de manière chronique par le HCV et 6 patients non-infectés (Boldanova *et al.*, 2017). A partir de ces données, dans un premier temps, j'ai analysé

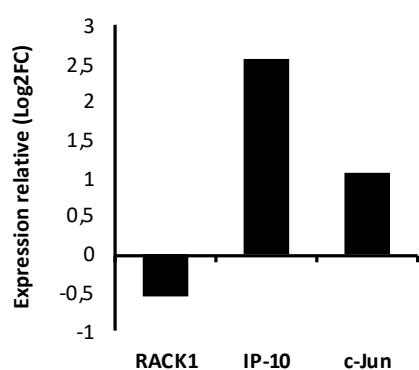


Figure 33. Etude de l'impact de l'infection par le HCV sur l'expression de RACK1, IP-10 et c-Jun chez les patients. L'étude du transcriptome a été réalisée sur des biopsies hépatiques provenant de 7 patients infectés de manière chronique par le HCV et de 6 patients non-infectés (données issues de Boldanova *et al.*, 2017). Les résultats sont exprimés en Log2FC. L'expression des différents gènes est statistiquement significative ($p < 0,05$, test de Wald)

l'impact de l'infection par le HCV sur l'expression de RACK1, du facteur de transcription c-Jun et de la chimiokine IP-10 (Figure 33). Les résultats montrent une forte induction de l'expression d'IP-10 chez les patients infectés avec un Log2FC de 2,5. L'induction de l'expression d'IP-10 chez les patients chroniquement infectés par le HCV a déjà été décrite dans la littérature (Reiberger *et al.*, 2008). Dans ce cas, IP-10 est un décrit comme un marqueur sérique de l'infection par le HCV et de la progression de la maladie hépatique. Les données transcriptomiques montrent également une augmentation de l'expression de c-Jun avec un Log2FC de 1. L'infection par le HCV induit une diminution de l'expression de

RACK1 avec un Log2FC de -0,53 correspondant à une diminution de l'expression d'environ 30 %. Ce résultat peut paraître surprenant car le HCV a besoin de RACK1 pour assurer sa traduction IRES-dépendante et que RACK1 est généralement surexprimée dans le CHC (Majzoub *et al.*, 2014; Ruan *et al.*, 2012).

2. Expression de RACK1 et d'IP-10 et activation de c-Jun dans des modèles cellulaires d'infection par le HCV

Par la suite, j'ai voulu observer l'impact de l'infection par le HCV sur l'expression de RACK1 et d'IP-10 et sur l'activation de c-Jun dans nos modèles cellulaires d'infection par le HCV afin de confirmer les données de transcriptomique. Dans un premier temps, j'ai utilisé un premier modèle, dit réplcatif, obtenu par transfection de l'ARN du HCV JcR2A par électroporation dans des cellules Huh7. L'électroporation est préférée à l'infection classique car elle permet d'obtenir un taux de cellules répliquant le virus proche de 100 %. L'ARN JcR2A du HCV possède l'avantage de coder une luciférase permettant de vérifier facilement l'infection virale par mesure de l'activité luciférase dans le lysat protéique. Après 4 jours, l'infection virale est considérée comme chronique et l'expression de RACK1 a été détectée par western blot et l'expression d'IP-10 a été détectée par RT-qPCR. De manière surprenante, l'infection des cellules Huh7 par HCV pendant 4 jours induit une forte diminution de l'expression de RACK1 dans ce modèle (**Figure 34A**). Par ailleurs, l'infection chronique induit également une augmentation de 15 fois de l'expression d'IP-10 mesurée par RT-qPCR (**Figure 34B**). L'infection HCV induit une diminution de l'expression de RACK1 et une augmentation de l'expression d'IP-10 et corrobore ce qui a été observé chez les patients.

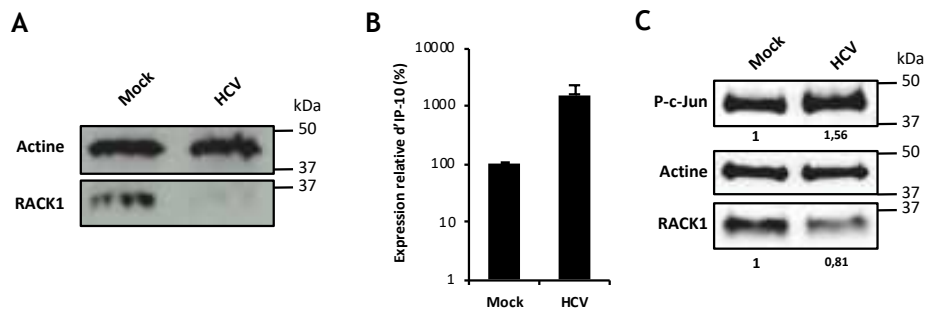


Figure 34. Impact de l'infection par HCV sur l'expression de RACK1 et d'IP-10 et sur l'activation de c-Jun. (A-B) Des cellules Huh7 ont été transfectées par électroporation avec un ARN HCV JcR2A afin de les infecter. Après 72 heures, l'expression de RACK1 a été analysée par western blot (A). Les ARN totaux ont également été extraits et l'expression de l'ARNm d'IP-10 a été analysée par RT-qPCR (B). (C) Des cellules Huh7.5.1 ont été différenciées par traitement au DMSO 1 % pendant une semaine. Elles ont ensuite été infectées par du virus HCV produit en culture cellulaire. Après 10 jours d'infection, l'expression de RACK1 et la phosphorylation de c-Jun ont été analysées par western blot. A Les résultats d'une expérience sont montrés, trois expériences indépendantes ont été réalisées. B Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SEM de l'expression relative de l'ARNm d'IP-10 à partir de 2 expériences (n=4). C L'intensité des bandes de P-c-Jun et de RACK1 ont été normalisées par rapport à l'actine et les valeurs relatives sont indiquées. Une expérience représentative a été réalisée.

Afin de mimer l'infection par le HCV de manière plus physiologique, j'ai utilisé un modèle basé sur la différenciation de cellules Huh7.5.1 (Huh7.5.1^{dif}) par traitement au DMSO. L'incubation de cellules Huh7.5.1 en présence de DMSO 1 % pendant une semaine induit une morphologie pavimenteuse de celles-ci ainsi que l'activation de voies métaboliques hépatiques leur conférant une physiologie plus proche d'un hépatocyte normal (Sainz & Chisari, 2006; données obtenues par Crouchet *et al.*, en cours de publication). Des cellules Huh7.5.1^{dif} ont été incubées en présence de virions HCV produits en culture cellulaire. Après 10 jours, l'expression de RACK1 ainsi que la forme phosphorylée de c-Jun ont été détectées par western blot. L'analyse des western blot montre que l'infection par HCV induit une baisse de l'expression de RACK1 d'environ 20 % ainsi qu'une augmentation de 50 % de la forme phosphorylée de c-Jun dans ces cellules (**Figure 34C**). De manière similaire aux observations faites chez les patients, l'infection par le HCV induit la baisse de l'expression de RACK1 dans les deux modèles d'étude cellulaires. Cette baisse de l'expression de RACK1 est accompagnée d'une augmentation de l'activation de c-Jun et de l'expression d'IP-10.

RACK1 étant fortement impliquée dans la régulation de nombreuses voies de signalisation de l'inflammation, nous avons émis l'hypothèse que la conjonction d'une baisse du taux de RACK1 associée au détournement par un « *sponge effect* » de RACK1 au profit de la traduction et de la réplication virales, pourrait expliquer, du moins en partie, l'inflammation hépatique observée chez les patients chroniquement infectés par le HCV.

3. RACK1 régule négativement l'expression d'IP-10

Afin d'étudier le rôle de RACK1 dans la régulation de l'inflammation hépatique, nous avons choisi une approche de perte-de-fonction appliquée sur une lignée cellulaire Huh7 dérivée d'hépatocarcinome humain susceptible à l'infection par HCV et présentant une réponse immunitaire innée plus complète que la lignée cellulaire Huh7.5.1 qui est plus classiquement utilisée pour l'infection par HCV. Pour cela, j'ai transfecté des cellules Huh7 avec un siARN unique ciblant *RACK1*. Après 3 jours, l'efficacité de diminution d'expression de RACK1 a été suivie par western blot. Une diminution très efficace de l'expression de RACK1 est observée (**Figure 35A**). Dans les cellules dont l'expression de RACK1 est diminuée, l'expression de l'ARNm d'IP-10 a été quantifiée par RT-qPCR et la sécrétion d'IP-10 a été quantifiée par ELISA. Comme présenté en **Figure 35B**, la diminution de l'expression de RACK1 induit une forte activation de la transcription d'IP-10 de l'ordre d'1 log. De même, la sécrétion

Résultats – Partie I

d'IP-10 dans ces cellules est augmentée de plus de 10 fois (**Figure 35C**). Ces résultats suggèrent qu'une diminution de RACK1 dans les cellules Huh7 conduit à l'activation d'une ou plusieurs voies inflammatoires menant à une surexpression d'IP-10.

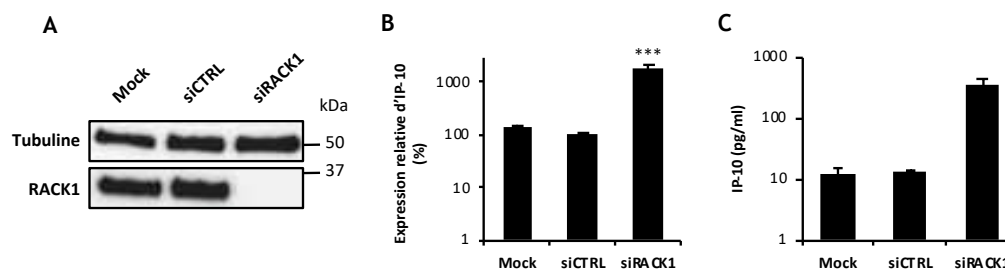


Figure 35. Le silencing de RACK1 dans les cellules Huh7 induit une surexpression d'IP-10. Des cellules Huh7 ont été transfectées avec un siARN ciblant *RACK1* (siRACK1) ou un siARN contrôle (siCTRL). Après 72 heures, l'efficacité de diminution de l'expression de RACK1 a été observée par western blot (**A**). L'expression de l'ARNm d'IP-10 et la sécrétion d'IP-10 ont été mesurées par RT-qPCR (**B**) et ELISA (**C**). **B** Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SEM de l'expression relative de l'ARNm d'IP-10 à partir de 3 expériences ($n=9$). *** $p < 0,001$ (test U de Mann-Whitney bilatéral). **C** Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SEM de la détection d'IP-10 dans le surnageant à partir de 2 expériences ($n=4$).

J'ai ensuite souhaité confirmer le rôle de RACK1 dans l'expression d'IP-10 dans des hépatocytes primaires humains (PHH) provenant de résections hépatiques de patients, les PHH étant un modèle cellulaire plus proche de la physiologie hépatique. La transfection de siARN ciblant *RACK1* induit également une forte diminution de l'expression de RACK1 dans les PHH (**Figure 36A**). La diminution de l'expression de RACK1 induit également une augmentation de la transcription de l'ARNm d'IP-10 et de la sécrétion d'IP-10. Cette augmentation est toutefois plus faible que celle observée dans le modèle Huh7 (**Figure 36B-C**). En effet, une augmentation de l'expression de l'ARNm d'IP-10 de 3 fois, et une augmentation de la sécrétion d'IP-10 de 2,5 fois sont mesurées en PHH. Il est à noter que les PHH ont une production basale d'IP-10 beaucoup plus élevée que les cellules Huh7 (800 pg/ml *versus* 10 pg/ml), ceci pouvant partiellement expliquer la différence d'activation de l'expression d'IP-10 lors de la diminution de l'expression de RACK1 dans les deux modèles.

En conclusion, l'absence de RACK1 induit une augmentation de la transcription de l'ARNm d'IP-10 et de sa sécrétion dans le milieu extracellulaire.

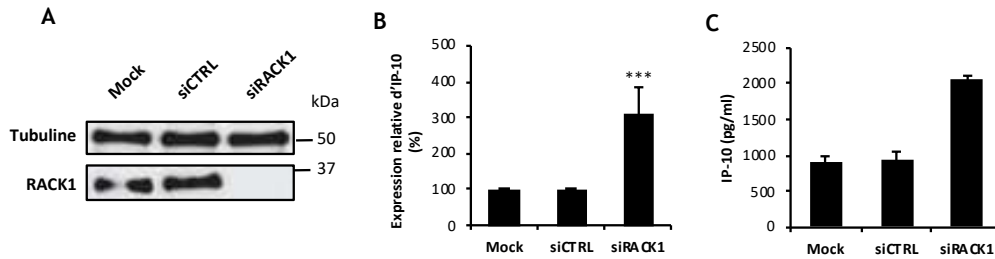


Figure 36. Le silencing de RACK1 dans les PHH induit une surexpression d’IP-10. Des PHH ont été transfectés avec un siARN ciblant *RACK1* (siRACK1) ou un siARN contrôle (siCTRL). Après 72 heures, l’efficacité de diminution de l’expression de RACK1 a été observée par western blot (A). L’expression de l’ARNm d’IP-10 et la sécrétion d’IP-10 ont été mesurées par RT-qPCR (B) et ELISA (C). B Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SEM de l’expression relative de l’ARNm d’IP-10 à partir de 3 expériences (n=9). *** $p < 0,001$ (test U de Mann-Whitney bilatéral). C Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SEM de la détection d’IP-10 dans le surnageant à partir de 2 expériences (n=4).

4. L’activation de l’expression d’IP-10 lors du silencing de RACK1 n’est pas due à la sécrétion d’une cytokine

L’expression d’IP-10 peut être modulée par l’activation de plusieurs voies pro-inflammatoires. Nous avons voulu vérifier si l’activation de l’expression d’IP-10 induite par le *silencing* de RACK1 était due à la sécrétion d’une cytokine pro-inflammatoire dans le

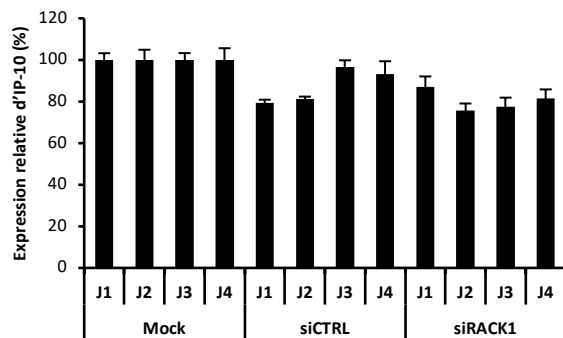


Figure 37. La surexpression d’IP-10 lors du *silencing* de RACK1 est due à un évènement intracellulaire. Des cellules Huh7 ont été transfectées avec un siARN ciblant *RACK1* (siRACK1) ou un siARN contrôle (siCTRL). Les surnageants de culture ont été récoltés 1, 2, 3 ou 4 jours (J1-J4) après transfection. Des cellules Huh7 naïves ont été traitées pendant 24 heures par les surnageants récoltés puis l’expression de l’ARNm d’IP-10 a été mesurée par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SEM de l’expression relative de l’ARNm d’IP-10 à partir de 3 expériences (n=9).

surnageant de culture menant à l’activation d’une voie de signalisation induisant la surexpression d’IP-10. Pour cela, les surnageants de cellules Huh7 transfectées avec un siARN ciblant *RACK1* ou un siARN contrôle ont été récoltés entre 1 et 4 jours post-transfection. Des cellules Huh7 naïves ont ensuite été incubées pendant 24 heures en présence des surnageants récoltés puis l’expression d’IP-10 a été quantifiée par RT-qPCR. Aucune augmentation de l’expression d’IP-10 n’est observée dans ces conditions (Figure 37).

L’activation de l’expression d’IP-10 lors du *silencing* de RACK1 n’est pas due à la production d’une cytokine pro-inflammatoire mais résulte d’un ou plusieurs évènements intracellulaires.

5. A la recherche de la voie de signalisation impliquée

Les principaux facteurs de transcription connus induisant l'expression d'IP-10 sont NF- κ B, composé des facteurs de transcription p65 et p50, AP-1, composé des facteurs de transcription c-Jun et c-Fos, le dimère de STAT1 phosphorylés et IRF3 (Figure 38). Ces différents facteurs de transcription sont connus pour être activés lors d'une infection par le HCV (*cf.* Introduction). De plus, RACK1 est impliquée dans la régulation de la plupart de ces voies de signalisation. RACK1 diminue l'activation de NF- κ B en inhibant l'interaction de TRAF2 avec le complexe IKK (Yao *et al.*, 2014). RACK1 diminue également l'activation d'IRF3 en exerçant un rétro-contrôle négatif par recrutement de la phosphatase PP2A qui désactive IRF3 (Long *et al.*, 2014). A l'inverse, trois études différentes ont montré que RACK1 interagit avec PKC induisant la phosphorylation de JNK, ce qui favorise l'activation de c-Jun (Guo *et al.*, 2013; López-Bergami *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2015). Afin de mieux comprendre le rôle de RACK1 dans la régulation de l'expression d'IP-10, j'ai voulu identifier la voie de signalisation et le(s) facteur(s) de transcription impliqués dans la surexpression d'IP-10 détectée lors du *silencing* de RACK1.

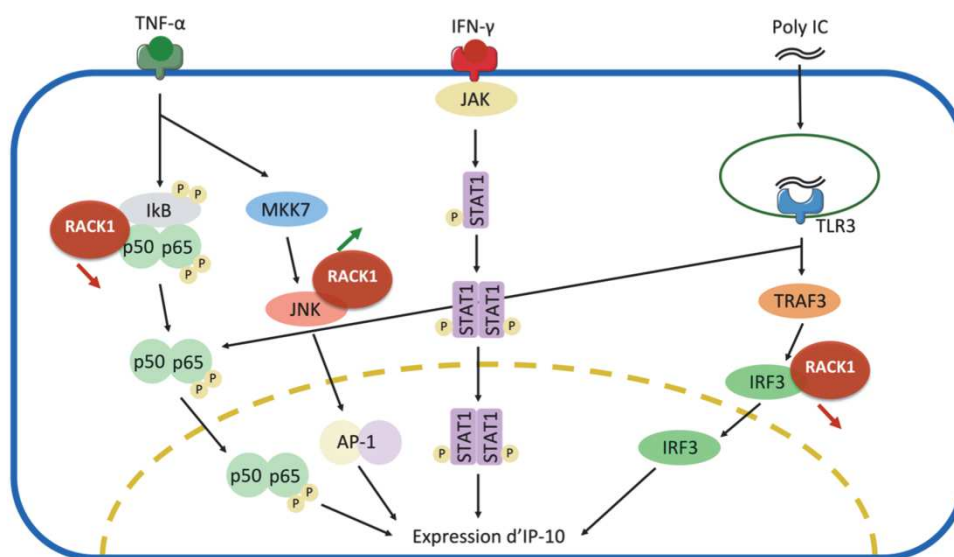


Figure 38. Représentation schématique des différentes voies de signalisation menant à l'expression d'IP-10 et les rôles connus de RACK1. Les voies de signalisation NF- κ B (p50/P65), AP-1 (c-Jun/c-Fos), IFN- γ et IRF3 menant à l'expression d'IP-10 sont représentées. RACK1 joue un rôle inhibiteur dans les voies NF- κ B (Yao *et al.*, 2012) et IRF3 (Long *et al.*, 2014) et un rôle activateur de la voie AP-1 (Guo *et al.*, 2013; López-Bergami *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2015).

a. La voie de l'IFN de type II

La chimiokine IP-10 a premièrement été décrite comme exprimée en réponse à l'IFN- γ (Poncz *et al.*, 1987). J'ai voulu vérifier si l'activation de l'expression d'IP-10 lors du *silencing* de

Résultats – Partie I

RACK1 était due à une activation de la voie de signalisation de l'IFN- γ . Pour cela, des cellules Huh7 ont été transfectées avec un siARN ciblant *RACK1* (siRACK1) ou un siARN contrôle (siCTRL), puis ont été traitées à l'IFN- γ (1000 U/ml) pendant 30 minutes, afin de suivre

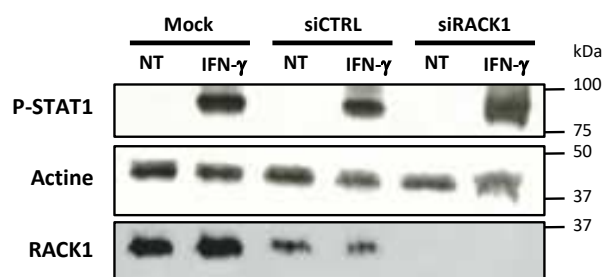


Figure 39. Détection de la phosphorylation de STAT1 lors du *silencing* de RACK1. Des cellules Huh7 ont été transfectées avec un siARN ciblant *RACK1* (siRACK1) ou un siARN contrôle (siCTRL). Après 72 heures, les cellules ont été traitées à l'IFN- γ (1000 U/ml) pendant 30 min puis la forme phosphorylée de STAT1 ainsi que RACK1 et l'actine ont été détectées par western blot. Les résultats ont été obtenus à partir d'une expérience représentative

l'activation de la voie IFN- γ en présence ou absence de RACK1 par western blot. L'activation de la voie de l'IFN- γ a été suivie par détection de la forme phosphorylée de STAT1 par western blot (Figure 39). Le traitement à l'IFN- γ induit la phosphorylation de STAT1 dans les différentes conditions, démontrant que cette voie est fonctionnelle dans le modèle Huh7. De plus, la diminution de l'expression de RACK1 induit une augmentation de la

phosphorylation de STAT1 de 20 % après traitement à l'IFN- γ . Cependant le *silencing* de RACK1 seul n'induit pas la phosphorylation de STAT1.

En conclusion, bien que RACK1 puisse avoir un rôle dans la régulation de la voie de l'IFN- γ après stimulation, l'activation de l'expression d'IP-10 détectée lors du *silencing* de RACK1 n'est pas due à une activation de la voie de l'IFN- γ .

b. La voie NF- κ B

La voie de signalisation NF- κ B est également l'une des voies pro-inflammatoires pouvant induire l'expression d'IP-10. Lors de l'activation de cette voie, le facteur de transcription p65 est activé et transloqué dans le noyau afin d'induire l'expression de gènes pro-inflammatoires. Afin de vérifier le rôle de RACK1 dans cette voie, j'ai suivi l'effet du *silencing* de RACK1 sur la localisation cellulaire de p65. Pour cela, des cellules Huh7 ont été transfectées avec un siARN ciblant *RACK1* ou un siARN contrôle (siCTRL). Trois jours après, les cellules ont été récoltées et lysées. Les fractions cytoplasmique et nucléaire ont ensuite été isolées et p65 a été détectée par western blot (Figure 40). Le calcul de la proportion de la fraction nucléaire de p65 relative à la fraction cytoplasmique montre que lors du *silencing* de RACK1 la proportion nucléaire de p65 monte à 23 % comparée à 13 % dans la condition

Résultats – Partie I

contrôle (**Figure 40**). Ce résultat tend à montrer une activation modérée de la voie NF- κ B lors du *silencing* de RACK1. Cependant, cette expérience doit être répétée et cette observation nécessite d'autres validations pour être confirmée.

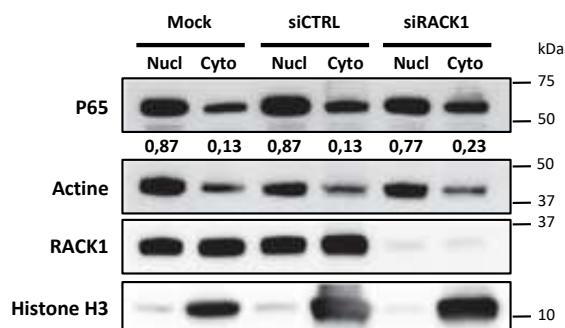


Figure 40. Détection de la relocalisation nucléaire de P65 lors du *silencing* de RACK1.

Des cellules Huh7 ont été transfectées avec un siARN ciblant *RACK1* (siRACK1) ou un siARN contrôle (siCTRL). Après 72 heures, les cellules ont été lysées et un fractionnement subcellulaire a été réalisé afin de séparer les fractions protéiques nucléaire (Nucl) et cytoplasmique (Cyto). Les protéines P65 et RACK1 ont été détectées par western blot. La détection de l'actine et de l'histone H3 sert de contrôle de charge et de pureté des fractions nucléaires et cytoplasmiques. L'intensité des bandes de P65 dans les fractions cytoplasmiques et nucléaires ont été normalisées par rapport à l'actine et les valeurs relatives sont indiquées. Les résultats ont été obtenus à partir d'une expérience représentative.

c. Co-transfection de siARN ciblant RACK1 et différents facteurs de transcription

L'étude individuelle des différentes voies de l'inflammation étant fastidieuse et les méthodes de détection de l'activation de ces voies n'étant pas toujours simples à mettre en œuvre, j'ai choisi une stratégie différente afin de déterminer quelle voie de signalisation est impliquée dans l'activation de l'expression d'IP-10 lors du *silencing* de RACK1. Pour cela, j'ai co-transfecté des cellules Huh7 avec un siARN ciblant *RACK1* et un siARN ciblant *p65*, *c-Jun* ou *IRF3*, des facteurs de transcription impliqués dans différentes voies pro-inflammatoires. Après 3 jours, l'expression de l'ARNm d'IP-10 a été quantifiée par RT-qPCR. La transfection des différents siARN ciblant les facteurs de transcription seuls montre que la diminution de l'expression de *c-Jun* et d'*IRF3* ne perturbe pas l'expression d'IP-10 (**Figure 41A**). Cependant, la diminution de l'expression de *p65* seule induit une diminution de l'expression d'IP-10 de plus de 90 %, indiquant que *p65* est impliquée dans l'expression basale d'IP-10 dans les cellules Huh7. La diminution conjointe de l'expression de RACK1 et de *p65* induit un retour de l'expression d'IP-10 au niveau basal. La diminution de l'expression de *c-Jun* et d'*IRF3* lorsque

Résultats – Partie I

l'expression de RACK1 est inhibée n'a pas d'effet additionnel sur l'expression de l'ARNm d'IP-10, comparé aux cellules transfectées avec siRACK1 seul (Figure 41A).

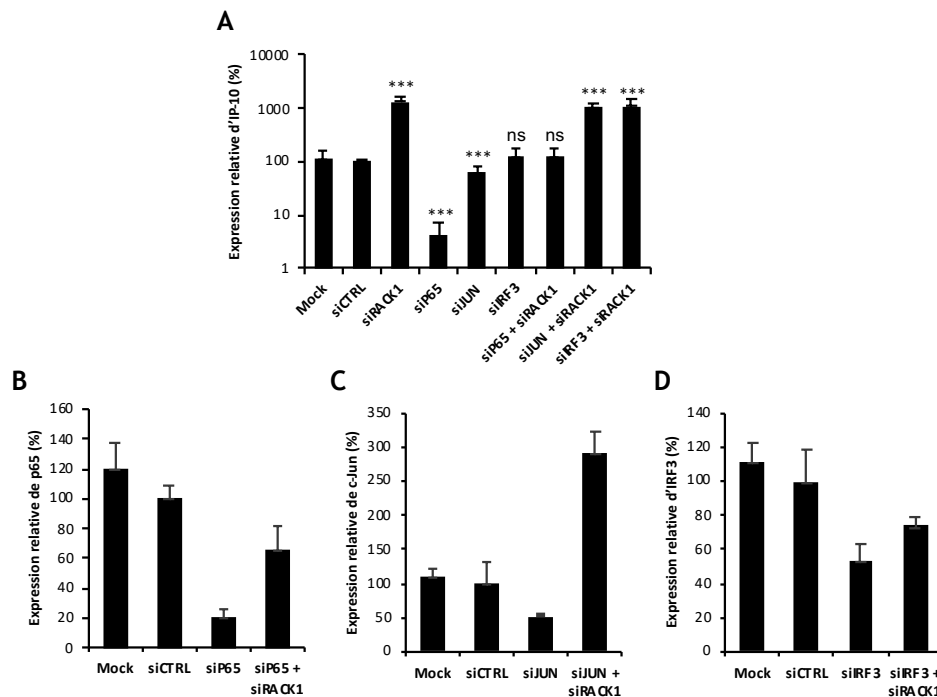


Figure 41. Co-transfection de siRACK1 avec des siARN ciblant des facteurs de transcription. Des cellules Huh7 ont été transfectées avec un siARN ciblant *RACK1* (siRACK1), les facteurs de transcription *p65* (siP65), *c-Jun* (siJUN) et *IRF3* (siIRF3) ou un siARN contrôle (siCTRL). Des cellules ont également été co-transfectées avec le siARN ciblant *RACK1* et les siARN ciblant les facteurs de transcription. Après 72 heures, l'expression de l'ARNm d'IP-10 a été analysée par RT-qPCR (A). Le contrôle des *silencing* a également été réalisé par détection des ARNm de p65 (B), c-Jun (C) et IRF3 (D) par RT-qPCR. A Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SEM de l'expression relative de l'ARNm d'IP-10 à partir de 3 expériences ($n=9$). *** $p < 0,001$, ns $p > 0,05$ (test U de Mann-Whitney bilatéral réalisé en comparaison de la condition siCTRL). B, C et D Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- l'écart type de l'expression relative de l'ARNm de p65, de c-Jun ou d'IRF3 à partir d'une expérience ($n=3$).

L'efficacité de la co-transfection pouvant être moins efficace qu'une transfection unique, j'ai quantifié en parallèle l'expression des facteurs de transcription par RT-qPCR (Figure 41B-D). Les conditions de co-transfection en présence des siARN ciblant *p65* et *IRF3* conduisent à une diminution moindre de leur expression, cependant la quantité relative d'ARNm des deux facteurs de transcription reste plus faible d'environ 25-30 % par rapport au contrôle. En revanche, lors de la co-transfection avec un siARN ciblant *c-Jun*, une augmentation de la quantité de l'ARNm de c-Jun de 2,5 fois est observée par rapport au contrôle (Figure 41C). Ce résultat suggère un effet activateur de la diminution d'expression de RACK1 sur la transcription de c-Jun. L'activation de l'expression et de l'activation de c-Jun par

RACK1 n'a jamais été montrée. En effet, trois études réalisées sur le rôle de RACK1 dans la régulation de JNK, ont montré que RACK1 participe à l'activation de JNK, la kinase impliquée dans l'activation de c-Jun par phosphorylation dont l'une montre que l'expression de RACK1 est corrélée à l'activation de JNK dans le CHC (Guo *et al.*, 2013; López-Bergami *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2015). Or, les résultats obtenus ici suggèrent un rôle négatif de RACK1 sur l'activation de c-Jun, la perte de l'expression de RACK1 induisant une augmentation de l'activation de c-Jun.

6. Le rôle de RACK1 sur le facteur de transcription c-Jun

Par la suite, j'ai souhaité confirmer l'impact de la diminution de l'expression de RACK1 sur l'expression et étudier son effet sur l'activation de c-Jun. Pour cela, des cellules Huh7 ont été transfectées avec un siARN ciblant RACK1 puis la transcription, l'expression et l'activation de c-Jun ont été suivies par RT-qPCR et western blot, respectivement. L'analyse par RT-qPCR

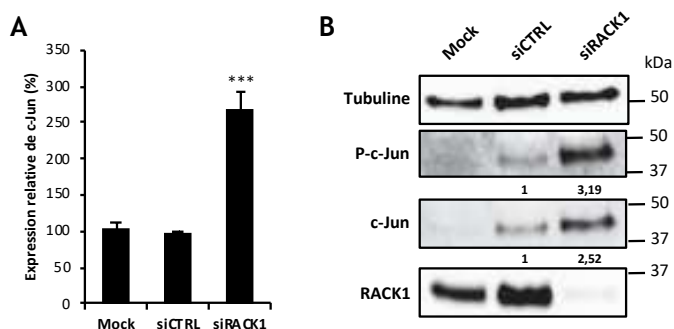


Figure 42. La diminution de l'expression de RACK1 induit une surexpression et une suractivation de c-Jun en cellules Huh7.

Des cellules Huh7 ont été transfectées avec un siARN ciblant RACK1 (siRACK1) ou un siARN contrôle (siCTRL). Après 72 heures, l'expression de l'ARNm de c-Jun a été analysée par RT-qPCR (A). L'expression de c-Jun ainsi que sa forme phosphorylée ont été détectées par western blot (B). A Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SEM de l'expression relative de l'ARNm de c-Jun à partir de 3 expériences (n=9). *** $p < 0,001$ (test U de Mann-Whitney bilatéral). B L'intensité des bandes de P-c-Jun et de c-Jun ont été normalisées par rapport à la tubuline et les valeurs relatives à cette expérience sont indiquées. Trois expériences indépendantes ont été réalisées.

montre que la diminution de l'expression de RACK1 induit une augmentation de la quantité d'ARNm de c-Jun de 2,5 fois par rapport à la condition contrôle (Figure 42A). La détection de c-Jun par western blot montre également une augmentation de 2,5 fois de l'expression de c-Jun lors du *silencing* de RACK1 comparée à la condition contrôle (Figure 42B). De plus, la détection de la forme phosphorylée de c-Jun montre que la baisse de l'expression de RACK1 induit également une suractivation

de c-Jun de plus de 3 fois par rapport au contrôle (Figure 42B). La diminution de l'expression de RACK1 induit donc une surexpression et une suractivation de c-Jun.

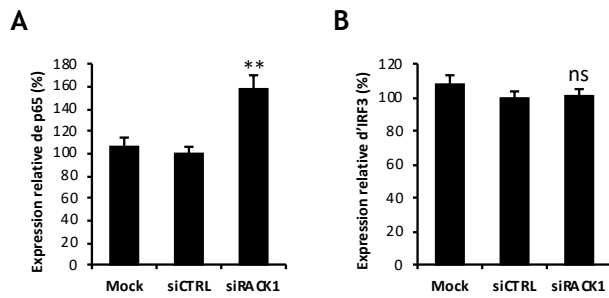


Figure 43. Impact de la diminution de l'expression de RACK1 sur l'expression de l'ARNm p65 et d'IRF3 en cellules Huh7. Des cellules Huh7 ont été transfectées avec un siARN ciblant *RACK1* (siRACK1) ou un siARN contrôle (siCTRL). Après 72 heures, l'expression de l'ARNm de p65 (A) et d'IRF3 (B) ont été analysées par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SEM de l'expression relative de l'ARNm de p65 et d'IRF3 à partir de 3 expériences ($n=6$). ** $p < 0,01$, ns $p > 0,05$ (test U de Mann-Whitney bilatéral).

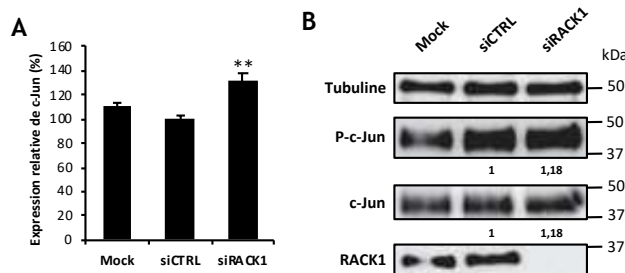


Figure 44. La diminution de l'expression de RACK1 induit une légère surexpression de c-Jun en PHH. Des cellules PHH ont été transfectés avec un siARN ciblant *RACK1* (siRACK1) ou un siARN contrôle (siCTRL). Après 72 heures, l'expression de l'ARNm de c-Jun a été analysée par RT-qPCR (A). L'expression de c-Jun ainsi que sa forme phosphorylée ont été détectées par western blot (B). A Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SEM de l'expression relative de l'ARNm de c-Jun à partir de 2 expériences ($n=6$). ** $p < 0,01$ (test U de Mann-Whitney bilatéral). B L'intensité des bandes de P-c-Jun et de c-Jun ont été normalisées par rapport à la tubuline et les valeurs relatives à cette expérience sont indiquées. Deux expériences indépendantes ont été réalisées.

statistique reste cependant à confirmer par répétition de l'expérience.

L'expression d'IP-10 peut être induite par un grand nombre de facteurs pouvant être activés par des voies distinctes. La faible surexpression de c-Jun détectée en PHH comparée aux cellules Huh7 pourrait indiquer que l'augmentation d'IP-10 est due à l'activation de c-Jun mais également à d'autres mécanismes indépendants.

En parallèle, l'expression de p65 et d'IRF3 a été détectée par RT-qPCR. Les résultats obtenus montrent que le *silencing* de RACK1 induit une légère augmentation d'environ 60 % de la transcription de p65 mais n'a aucun effet sur la transcription d'IRF3 (Figure 43A-B).

J'ai ensuite voulu confirmer le rôle de RACK1 sur la régulation de l'expression et l'activation de c-Jun en PHH. La même expérience de transfection de siARN a été réalisée puis l'expression et l'activation de c-Jun ont été analysées respectivement par RT-qPCR et western blot. La détection de l'ARNm de c-Jun ne montre qu'une faible augmentation de l'expression d'environ 30 % due au *silencing* de RACK1 (Figure 44A). Une augmentation d'environ 18 % est également détectée par western blot (Figure 44B). Cependant, aucune suractivation significative de c-Jun n'a été observée, comparée à la surexpression, suite à la diminution de l'expression de RACK1 (Figure 44B). La significativité

L'expression de p65 et d'IRF3 a également été détectée par RT-qPCR. La diminution de l'expression de RACK1 dans les PHH induit une augmentation de la transcription de l'ARNm de p65 de 15 % et une diminution de la transcription de l'ARNm d'IRF3 de 20 % (Figure 45A-B). La significativité de ces résultats reste cependant à confirmer par western blot.

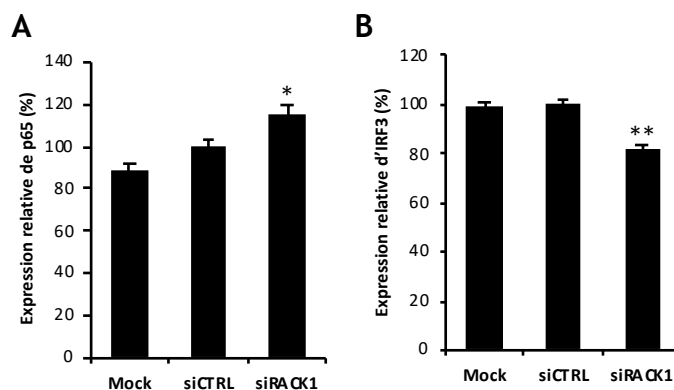


Figure 45. Impact de la diminution de l'expression de RACK1 sur l'expression de l'ARNm de p65 et d'IRF3 en PHH. Des PHH ont été transfectés avec un siARN ciblant *RACK1* (siRACK1) ou un siARN contrôle (siCTRL). Après 72 heures, l'expression de l'ARNm de p65 (A) et d'IRF3 (B) ont été analysées par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SEM de l'expression relative de l'ARNm de p65 et d'IRF3 à partir de 3 expériences ($n=6$). ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ (test U de Mann-Whitney bilatéral).

7. Recherche du mécanisme impliqué dans la surexpression de c-Jun et d'IP-10

L'expression de c-Jun peut être induite par différents stress ou stimuli cellulaires cependant, les mécanismes fins de régulation ne sont pas toujours connus. Dans les hépatocytes, le stress du reticulum induit l'expression de c-Jun afin de protéger l'hépatocyte contre les dommages cellulaires (Fuest *et al.*, 2012). Il a également été montré que le traitement de PHH avec des FFA induit l'expression de c-Jun et que chez les patients atteints de NAFLD (*Non-alcoholic fatty liver disease*), la surexpression de c-Jun est corrélée à l'inflammation hépatique (Dorn *et al.*, 2014). Enfin, il est également connu que l'activation d'EGFR active la voie JNK/AP-1 et qu'AP-1, composé de c-Jun et de c-Fos, amplifie son propre signal en induisant l'expression de c-Jun (Meng & Xia, 2011).

Lors d'un stress du RE, RACK1 participe à l'activation de l'autophagie afin de protéger la cellule de l'apoptose (Liu *et al.*, 2016). La déplétion de RACK1 dans des cellules HepG2 et dans le foie murin induit une perte de l'autophagie et une accumulation des lipides intracellulaires entraînant l'apparition de tumeurs spontanées chez la souris (Zhao *et al.*, 2015). RACK1 a également été identifiée dans le complexe formé par EGFR, Lyn et PKC,

Résultats – Partie I

cependant son rôle dans le complexe n'a pas été identifié (Sutton *et al.*, 2013). De ce fait, une diminution de l'expression de RACK1 pourrait entraîner une perturbation de l'autophagie, de l'accumulation de lipides intracellulaires ou de l'activation d'EGFR pouvant mener à la surexpression de c-Jun et d'IP-10. Dans cette partie, je vais présenter les résultats obtenus sur ces différentes voies de signalisation dans le but d'identifier le mécanisme induisant la surexpression de c-Jun et d'IP-10 lors de la diminution de l'expression de RACK1.

a. Le stress du reticulum endoplasmique

Lors d'un stress du reticulum endoplasmique dans les hépatocytes, l'expression de c-Jun est induite et protège l'hépatocyte contre les dommages cellulaires et l'apoptose en activant la macroautophagie (Fuest *et al.*, 2012). J'ai voulu déterminer si dans notre modèle, la diminution de l'expression de RACK1 induit un stress du RE et si l'induction du stress du RE mène à l'expression de c-Jun. Pour cela, j'ai transfecté des cellules Huh7 avec un siARN ciblant *RACK1* ou un siARN contrôle. Après 3 jours j'ai traité les cellules avec de la tunicamycine (10 µg/ml), un inducteur du stress du RE, pendant 6 heures. L'expression de c-Jun a été quantifiée par RT-qPCR. Les résultats obtenus montrent que le traitement à la tunicamycine induit une augmentation de la transcription de c-Jun de 6 fois en l'absence de *silencing* de RACK1. Cependant, lorsque l'expression de RACK1 est diminuée, le traitement à la tunicamycine n'induit une augmentation de l'expression de c-Jun que de 3,5 fois (Figure 46A). De ce fait, l'induction de l'expression de c-Jun par la tunicamycine est plus faible dans les cellules dépletées de RACK1.

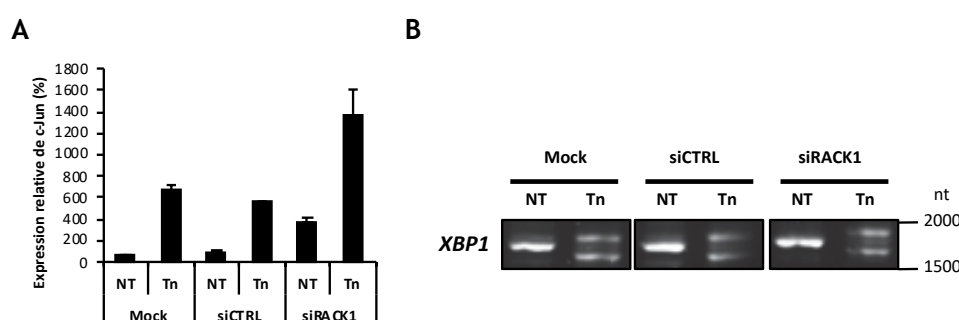


Figure 46. Impact de la diminution de l'expression de RACK1 sur le stress du RE. Des cellules Huh7 ont été transfectées avec un siARN ciblant *RACK1* (siRACK1) ou un siARN contrôle (siCTRL). Après 72 heures, les cellules ont été traitées à la tunicamycine (10 µg/ml) pendant 6 heures. L'expression de l'ARNm de c-Jun a été analysée RT-qPCR (A). L'épissage de l'ARNm de *XBP1* a été analysé par RT-PCR (B). **A** Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SEM de l'expression relative de l'ARNm de c-Jun à partir d'une expérience ($n=3$). **B** Une expérience représentative a été réalisée.

L'induction du stress du RE a été vérifiée par l'analyse de l'épissage de l'ARNm de *XBP1*. L'ARNm de *XBP1* a été amplifié par RT-PCR, puis déposé sur gel. Le traitement à la tunicamycine induit l'épissage de *XBP1* observé par l'apparition de deux bandes sur le gel (**Figure 46B**). Cependant, la diminution de l'expression de RACK1 seule n'induit pas l'épissage de l'ARNm de *XBP1* indiquant que dans cette condition le stress du RE n'est pas induit.

Le mécanisme par lequel la diminution de l'expression de RACK1 induit la surexpression de c-Jun n'est donc pas dû au stress du RE.

b. L'autophagie

RACK1 est impliquée dans l'induction de l'autophagie à deux niveaux. Sous sa forme non-phosphorylée, RACK1 est liée au ribosome et inhibe la traduction de Beclin-1, un composant majeur du complexe d'autophagie (Li Xiang *et al.*, 2019). La phosphorylation de RACK1 sur la thréonine 50 par AMPK (*Adenosine monophosphate-activated protein kinase*) induit sa libération du ribosome et la traduction de Beclin-1 ainsi que l'interaction de RACK1 et de Beclin-1 menant à l'induction de l'autophagie. Dans des cellules HepG2 dérivées d'hépatocarcinome humain et dans le foie murin, une déficience en RACK1 mène à une perte de l'induction de l'autophagie. Ceci induit une accumulation lipidique dans le foie murin et l'apparition spontanée de tumeurs (Zhao *et al.*, 2015). Dans le modèle Huh7, l'accumulation de lipides peut être mimée par le traitement des cellules avec des acides gras libres (FFA – *free fatty acid*). Afin de vérifier si la diminution de l'expression de RACK1 induit l'accumulation de lipides intracellulaires, j'ai transfecté des cellules Huh7 avec un siARN ciblant *RACK1* ou un siARN contrôle. En parallèle, des cellules Huh7 non transfectées ont été traitées par des FFA (acide oléique 800 μ M et acide palmitique 400 μ M) pendant 72 heures. L'accumulation de lipides neutres intracellulaires est révélée par le marquage fluorescent des lipides neutres par le Bodipy. Le traitement FFA induit bien une accumulation lipidique observée par la fluorescence verte induite par le Bodipy (**Figure 47A**). En revanche, la diminution de l'expression de RACK1 n'induit pas d'accumulation de lipides intracellulaires. En parallèle, l'expression de c-Jun et d'IP-10 a été détectée par RT-qPCR. Le traitement FFA n'induit pas d'augmentation de la transcription de ces protéines contrairement au *silencing* de RACK1

Résultats – Partie I

(Figure 47B). La surexpression de c-Jun et d'IP-10 induite par la diminution de l'expression de RACK1 n'est pas due à un stress causé par l'accumulation de lipides intracellulaires.

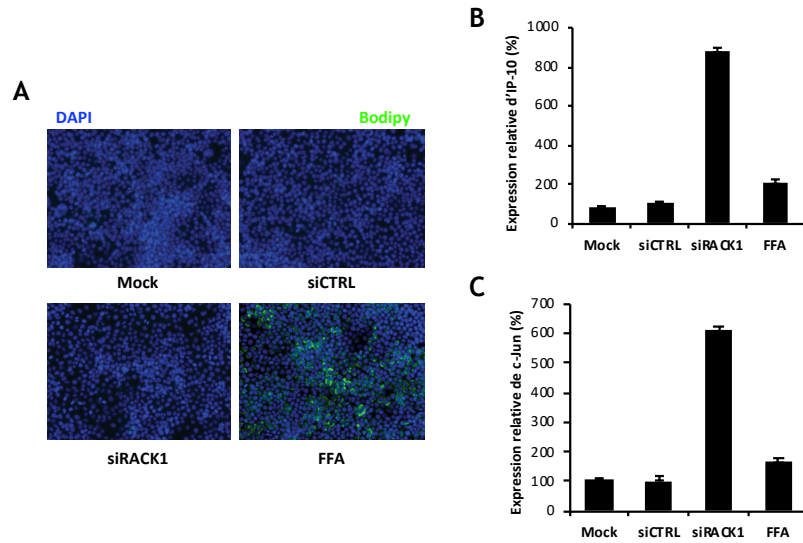


Figure 47. Impact de la diminution de l'expression de RACK1 sur l'accumulation d'acides gras. Des cellules Huh7 ont été transfectées avec un siARN ciblant *RACK1* (siRACK1) ou un siARN contrôle (siCTRL). En parallèle, des cellules Huh7 ont été cultivées en présence de FFA (acide oléique 800 μ M + acide palmitique 400 μ M) afin d'induire l'accumulation d'acides gras. (A) Après 72 heures, les cellules ont été fixées et les lipides neutres intracellulaires ont été marqués par du Bodipy (fluorescence verte). Les noyaux ont été colorés par du DAPI. Les ARN totaux ont également été extraits et l'expression des ARNm d'IP-10 (B) et de c-Jun (C) a été mesurée par RT-qPCR. B et C Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SEM de l'expression relative de l'ARNm d'IP-10 et de c-Jun à partir d'une expérience ($n=3$).

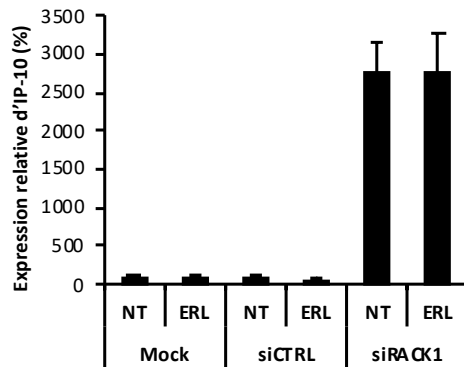


Figure 48. Étude du rôle de l'activation d'EGFR dans la surexpression d'IP-10. Des cellules Huh7 ont été transfectées avec un siARN ciblant *RACK1* (siRACK1) ou un siARN contrôle (siCTRL). Après 48 heures, les cellules ont été traitées à l'erlotinib (ERL ; 10 μ M) pendant 24 heures. L'expression de l'ARNm d'IP-10 a été mesurée par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SEM de l'expression relative de l'ARNm d'IP-10 à partir d'une expérience ($n=3$).

c. EGFR

La stimulation de EGFR induit l'activation de JNK et la phosphorylation de c-Jun dans un modèle d'hépatocytes isolés à partir de foie de rat (Wang *et al.*, 2008). Lors d'une infection par HCV, l'activation de EGFR induit l'activation de différentes voies de signalisation menant à la progression de la maladie hépatique par l'expression d'ISG ou de chimiokines pro-inflammatoires (Groeper *et al.*, 2018; Suarez *et al.*, 2018). L'erlotinib est un inhibiteur spécifique de l'activation d'EGFR et

permet d'inhiber l'entrée du HCV dans les hépatocytes (Lupberger *et al.*, 2011). J'ai souhaité vérifier si l'induction de l'expression d'IP-10 lors de la diminution de l'expression de RACK1 était due à l'activation d'EGFR. Pour cela, des cellules Huh7 ont été transfectées avec un siARN ciblant *RACK1* ou un siARN contrôle. Après 2 jours, les cellules ont été traitées à l'erlotinib (10 μ M) pendant 24 heures puis l'expression d'IP-10 a été observée par RT-qPCR. Les résultats obtenus montrent que le traitement à l'erlotinib de cellules dont l'expression de RACK1 est diminuée n'induit pas l'inhibition de l'expression d'IP-10 comparée aux cellules non-traitées (Figure 48). La surexpression d'IP-10 lors de la diminution de l'expression de RACK1 n'est donc pas due à une activation d'EGFR.

8. Effet de la diminution de l'expression de RACK1 dans des cellules Huh7.5.1

La lignée cellulaire Huh7.5.1 est dérivée de la lignée Huh7 et a été sélectionnée pour sa plus grande permissivité à l'infection par HCV. Cette lignée comporte une mutation dans l'hélicase RIG-I altérant la détection de l'ARN du HCV et la mise en place d'une réponse antivirale robuste (Sumpter *et al.*, 2005). L'activation de RIG-I par le HCV mène à l'activation d'IRF3/7 et de NF- κ B pouvant exprimer IP-10 (Figure 15). Afin d'observer si RIG-I est impliqué dans l'induction de l'expression d'IP-10 lors du *silencing* de RACK1, j'ai transfecté des cellules Huh7.5.1 avec un siARN ciblant *RACK1* ou un siARN contrôle. Après 3 jours, le *silencing* de RACK1 et l'expression et l'activation de c-Jun ont été analysés par western blot (Figure 49A). L'analyse par western blot montre que la diminution de l'expression de RACK1 induit une

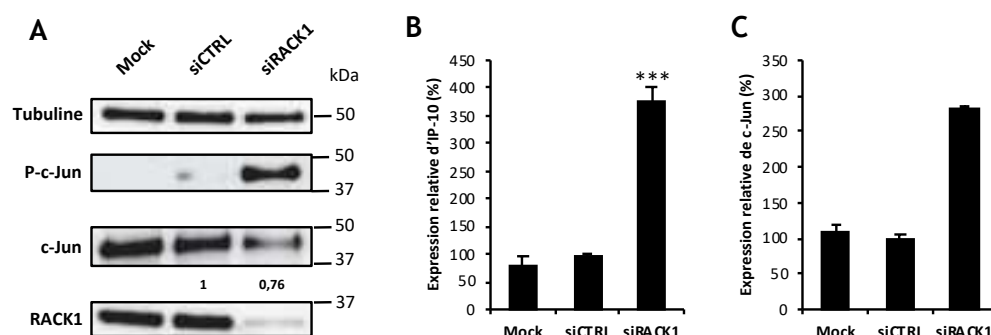


Figure 49. La diminution de l'expression de RACK1 induit la surexpression d'IP-10 et la suractivation de c-Jun en cellules Huh7.5.1. Des cellules Huh7.5.1 ont été transfectées avec un siARN ciblant *RACK1* (siRACK1) ou un siARN contrôle (siCTRL). Après 72 heures, l'expression de c-Jun ainsi que son activation ont été analysées par western blot (A). L'expression d'IP-10 (B) de c-Jun (C) a également été analysée par RT-qPCR. A Une expérience représentative est montrée. B Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SEM de l'expression relative de l'ARNm d'IP-10 à partir de 3 expériences (n=9). *** $p < 0,001$ (test U de Mann-Whitney bilatéral). C Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SEM de l'expression relative de l'ARNm de c-Jun à partir d'une expérience (n=3).

légère sous-expression de c-Jun mais induit une forte suractivation de c-Jun. L'expression d'IP-10 et de c-Jun a également été analysée par RT-qPCR. La diminution de l'expression de RACK1 induit une activation de l'expression d'IP-10 dans les cellules Huh7.5.1 (**Figure 49B**). Cependant, cette induction est plus faible que celle observée en Huh7. Le *silencing* de RACK1 dans la lignée Huh7.5.1 induit une activation de la transcription de l'ARNm de c-Jun similaire à celle observée dans les lignées Huh7 (**Figure 49C**), bien que la surexpression n'ait pas été observée par western blot (**Figure 49A**). Les différences d'expression et de suractivation de c-Jun restent cependant à confirmer par répétition du western blot dans ces conditions. La diminution de l'expression de RACK1 induisant une forte activation de c-Jun mais une activation de l'expression d'IP-10 plus faible que celle observée en Huh7, la surexpression d'IP-10 lors du *silencing* de RACK1 pourrait être multifactorielle et partiellement due à l'activation de RIG-I.

9. Effet de la diminution de l'expression de RACK1 dans des cellules HepG2

Dans notre laboratoire, les cellules HepG2 constituent notre troisième modèle de lignée cellulaire dérivée d'hépatocarcinome humain. Ces cellules sont polarisées et possèdent des caractéristiques physiologiques différentes des cellules Huh7. J'ai également utilisé ce modèle dans le cadre d'un *silencing* de RACK1 afin d'analyser les effets de cette diminution sur l'expression de c-Jun et d'IP-10. Pour cela, des cellules HepG2 ont été transfectées avec un siARN ciblant *RACK1* ou un siARN contrôle. Après 3 jours, les lysats protéiques ont été préparés afin de suivre le *silencing* de RACK1 et l'expression et l'activation de c-Jun par western blot (**Figure 50A**). L'analyse par western blot montre que la diminution de l'expression de RACK1 induit une légère surexpression de c-Jun mais pas sa suractivation comparée au contrôle. Les ARN totaux ont également été isolés et l'expression de c-Jun et d'IP-10 a été mesurée par RT-qPCR. Les résultats obtenus montrent que la baisse de l'expression de RACK1 induit la surexpression de c-Jun d'environ 80 % par rapport au contrôle (**Figure 50B**). Cette surexpression est cependant plus faible que celle observée en Huh7. En revanche, le *silencing* de RACK1 n'induit pas la surexpression d'IP-10 en cellules HepG2 qui reste sous la limite de détection. Cette observation tend à montrer que la surexpression d'IP-10 observée en Huh7 lors de la diminution de l'expression de RACK1 est indépendante de la surexpression de c-Jun.

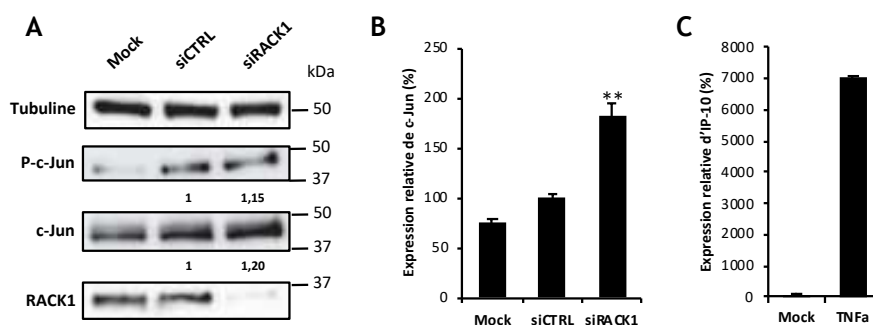


Figure 50. La diminution de l'expression de RACK1 induit la surexpression de c-Jun en cellules HepG2. (A-B) Des cellules HepG2 ont été transfectées avec un siARN ciblant *RACK1* (siRACK1) ou un siARN contrôle (siCTRL). Après 72 heures, l'expression de c-Jun ainsi que son activation ont été analysées par western blot (A). L'expression de l'ARNm de c-Jun a également été mesurée par RT-qPCR (B). (C) Des cellules HepG2 ont été traitées au TNF- α (25 ng/ml) pendant 6 h puis l'expression de l'ARNm d'IP-10 a été mesurée par RT-qPCR. A L'intensité des bandes de P-c-Jun et de c-Jun ont été normalisées par rapport à la tubuline et les valeurs relatives sont indiquées. Deux expériences ont été réalisées. B Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SEM de l'expression relative de l'ARNm de c-Jun à partir de 2 expériences ($n=6$). ** $p < 0,01$ (test U de Mann-Whitney bilatéral). C Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SEM de l'expression relative de l'ARNm d'IP-10 à partir d'une expérience ($n=3$).

Pour confirmer ce résultat, j'ai vérifié si la lignée HepG2 est capable d'exprimer IP-10. Pour cela, j'ai traité des cellules HepG2 pendant 6 heures avec du TNF- α afin d'induire l'expression d'IP-10, puis les ARN totaux ont été extraits afin de mesurer l'expression de l'ARNm d'IP-10 par RT-qPCR (Figure 50C). Les résultats obtenus montrent que le traitement au TNF- α induit l'expression d'IP-10, confirmant la capacité des cellules HepG2 d'exprimer IP-10. De ce fait, la surexpression de c-Jun induite par le *silencing* de RACK1 en HepG2 n'est pas corrélée à la surexpression de l'ARNm d'IP-10.

10. Étude du transcriptome en condition de silencing de RACK1

Les effets de la diminution de RACK1 sur la régulation de l'immunité innée étant multiples, j'ai voulu avoir une image globale des perturbations induites. Pour cela, un séquençage total du transcriptome de cellules Huh7 a été réalisé sur des cellules transfectées avec un siARN ciblant *RACK1* ou contrôle. J'ai d'abord réalisé une étude individuelle de gènes impliqués dans les voies de signalisation RIG-I et NF- κ B (Figure 51). L'étude de la voie RIG-I montre que différents acteurs précoces de la voie, RIG-I, MAVS, TRAF3 et TRAF6, sont surexprimés lorsque l'expression de RACK1 est diminuée. L'expression de plusieurs activateurs de la voie NF- κ B dont IKBKG (*Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit gamma*), IKBKE (*Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit epsilon*), TANK (*TRAF family*

member associated NF-κB activator) et TBK1 (*TANK binding kinase 1*), ainsi que de plusieurs inhibiteurs dont NFKBIA (*NF-κB inhibitor alpha*) et NKRF (*NF-κB repressing factor*) est également augmentée lors du *silencing* de RACK1.

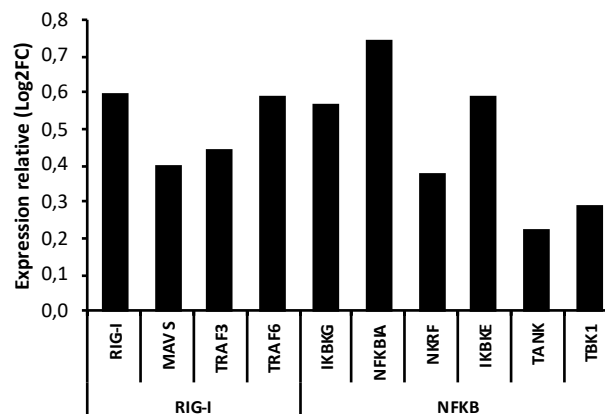


Figure 51. La diminution de l'expression de RACK1 induit la surexpression de gènes impliqués dans les voies RIG-I et NF-κB. Une analyse transcriptomique de cellules Huh7 transfectées avec un siARN ciblant *RACK1* ou un siARN contrôle a été réalisée. L'expression de 4 gènes appartenant à la voie de signalisation de RIG-I et de 6 gènes appartenant à la voie de signalisation NF-κB est significativement augmentée lorsque l'expression de *RACK1* est diminuée ($p < 0,05$, test de Wald). L'expression des gènes est représentée en Log2 Fold Change (Log2FC).

Une étude plus approfondie de la cinétique d'expression de ces gènes dans ces conditions est nécessaire afin notamment de savoir si l'expression des inhibiteurs de la voie NF-κB a lieu de manière précoce ou si elle est induite par un rétro-contrôle négatif dû à une

suractivation des activateurs de cette voie. En effet, une étude de la cinétique d'expression permettra de savoir si différentes voies de l'inflammation sont activées puis inhibées de manière séquentielle ou si à l'inverse l'état inflammatoire observé lors du *silencing* de *RACK1* est dû à des mécanismes plus figés. La diminution de l'expression de *RACK1* lors de la transfection du siARN étant progressive, il est probable que des événements précoces participent à la mise en place ou à la régulation de l'état inflammatoire mais que ceux-ci ne soient plus détectés après 3 jours.

Une analyse bioinformatique a ensuite été réalisée par analyse de l'enrichissement de groupes de gènes donnés participant à des voies de régulation communes. De manière intéressante, la diminution de l'expression de *RACK1* entraîne une diminution de l'expression d'un grand nombre de protéines ribosomiques dans les cellules Huh7 (Figure 52A). De plus, un grand nombre de gènes faisant partie de la réponse à l'IFN-α est surexprimé lors du *silencing* de *RACK1*, confirmant les observations de l'activation de voies de la réponse immunitaire innée (Figure 52B). Il est à noter que plusieurs de ces gènes ne sont pas spécifiques de la réponse à l'IFN-α mais interviennent dans différentes voies de l'immunité innée. Notre hypothèse de départ étant de savoir si lors d'une infection par HCV le virus

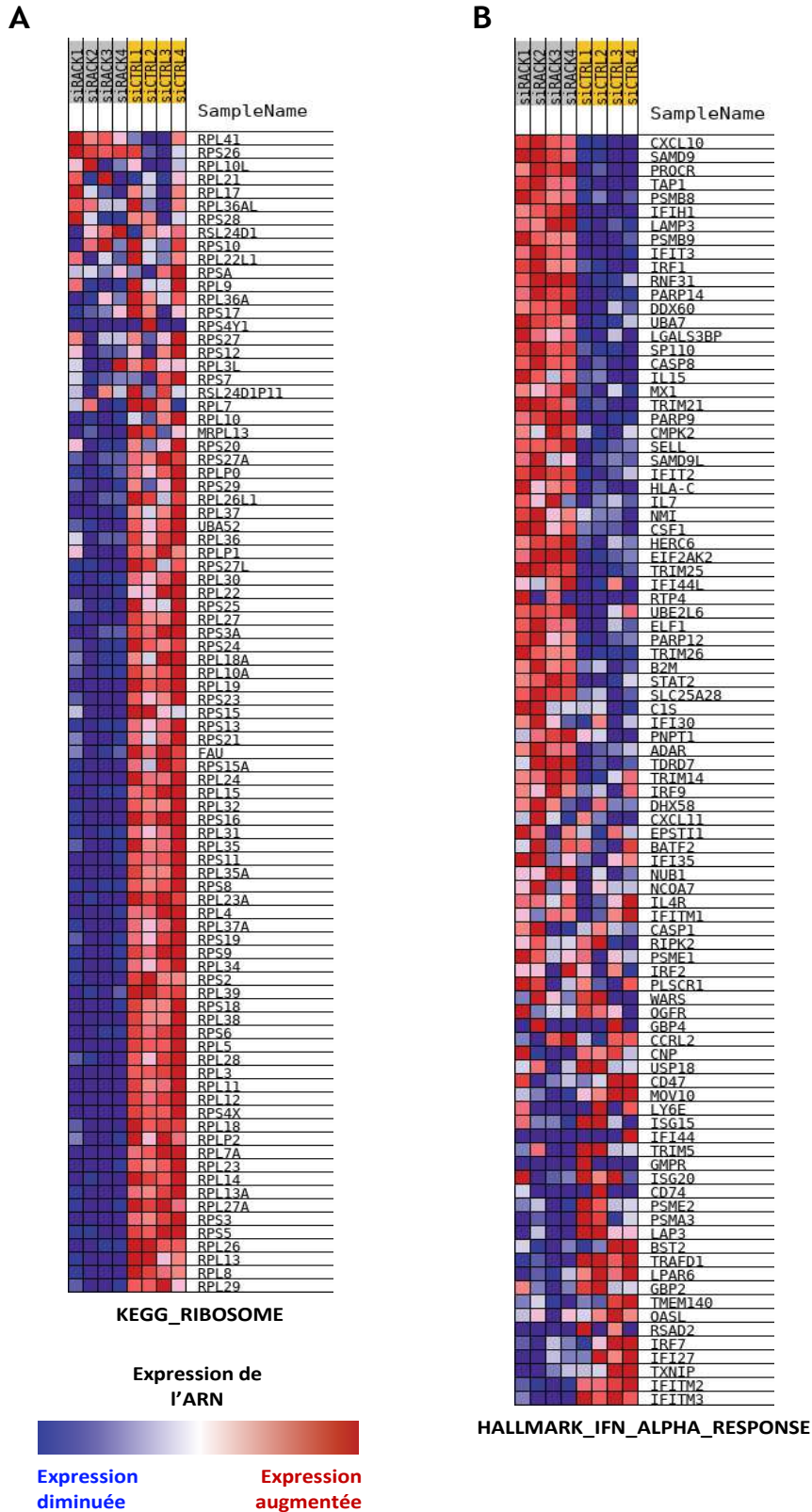


Figure 52. Analyse du transcriptome par enrichissement de groupes de gènes. L'analyse comparative du transcriptome de la condition siRACK1 et de la condition siCTRL par enrichissement de groupes de gènes (GSEA – *gene set enrichment analysis*) a été réalisée. Les résultats sont représentés pour les groupes de gènes annotés KEGG_RIBOSOME (A) et HALLMARK_IFN_ALPHA_RESPONSE (B) dont l'expression est modifiée de manière significative ($p < 0,25$, test de Wald).

détourne RACK1 de ses fonctions régulatrices, j'ai voulu observer si l'induction de gènes de l'immunité induite par la diminution de l'expression de RACK1 est également retrouvée chez les patients infectés par HCV. Pour cela, j'ai sélectionné les 30 gènes faisant partie de la réponse à l'IFN- α les plus surexprimés lors de la diminution de l'expression de RACK1. J'ai ensuite comparé leur expression à celle observée dans une cohorte de 7 patients infectés de manière chronique par le HCV dont l'expression relative du transcriptome a été réalisée en comparaison à une cohorte de 6 patients sains (Boldanova *et al.*, 2017). Sur les 30 gènes, 21 sont également surexprimés de manière significative chez les patients HCV positifs (Figure 53). Les similitudes retrouvées dans la régulation de différents gènes de l'inflammation lors du *silencing* de RACK1 et chez les patients infectés par le HCV suggère que le HCV séquestre RACK1 afin de subvenir à son cycle viral et induit une perturbation de la régulation de voies de l'inflammation pouvant mener à l'inflammation chronique.

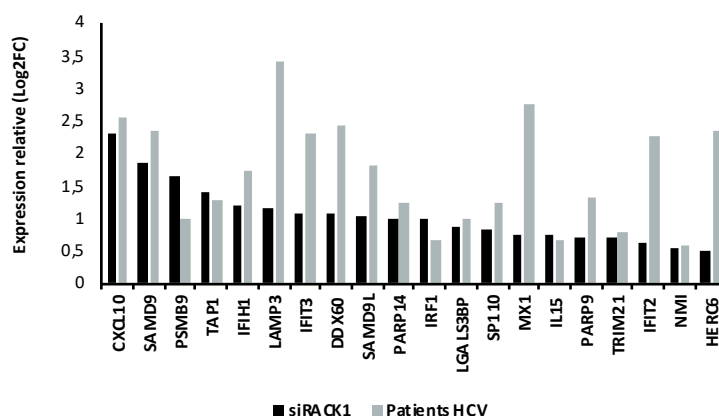


Figure 53. Analyse comparative de transcriptomes issus de cellules dépletées de RACK1 et de patients infectés par le HCV. L'analyse comparative est réalisée sur l'expression différentielle induite par la diminution de l'expression de RACK1 en cellule Huh7 (siRACK1 *versus* siCTRL) ou l'infection par le HCV (Patients HCV *versus* Patients sains). L'expression relative est représentée en Log2FC relative aux contrôles respectifs. Les gènes sont issus du GSEA IFN_ALPHA et font partie des 30 gènes les plus fortement surexprimés dans la condition siRACK1 (Figure 51). Les données de transcriptomique issues de patients infectés par HCV sont issues de Boldanova *et al.*, 2017. L'expression relative des différents gènes est statistiquement significative ($p < 0,05$, test de Wald).

11. Établissement d'une lignée permettant le criblage de petites molécules inhibant l'interaction entre RACK1 et le ribosome

L'infection par le HCV entraîne le développement de maladies hépatiques telles que la fibrose et la cirrhose pouvant mener au développement d'un CHC. En 2015, l'OMS a estimé qu'environ 399 000 patients sont décédés de complications hépatiques imputées à une

infection par le HCV (OMS, 2015). La mise sur le marché de DAA a permis de largement améliorer la prise en charge thérapeutique et le taux de RVS dans le traitement de l'infection chronique par le HCV dépassant maintenant les 90 % (Asselah *et al.*, 2016; Li & De Clercq, 2017). Cependant, le coût de ces traitements les rend peu disponibles notamment dans les pays en voie de développement et des résistances ont déjà été observées (Nitta *et al.*, 2019; Suda *et al.*, 2017). De plus, aucun vaccin n'est disponible permettant de prévenir les nouvelles infections par le HCV. De ce fait, le HCV reste un problème de santé publique majeur.

Plus récemment, le concept de HTA dans le développement de nouvelles molécules antivirales a gagné en importance (Crouchet *et al.*, 2018). RACK1 est une protéine pouvant être trouvée sous forme libre ou liée au ribosome. Lors d'une infection par HCV, la forme ribosomale de RACK1 est nécessaire pour la traduction IRES-dépendante du génome viral (Majzoub *et al.*, 2014). De plus, la forme ribosomale de RACK1 promeut la croissance et favorise la chimiorésistance chez les patients atteints de CHC (Ruan *et al.*, 2012). La forme libre de RACK1 est impliquée dans la régulation de multiples voies de signalisation et ses rôles multiples rendent difficile l'étude précise d'un rôle lorsque l'expression globale de RACK1 est diminuée (Adams *et al.*, 2011). Les acides aminés R36 et K38 sont conservés et impliqués dans la liaison de RACK1 au ribosome et un double mutant de RACK1 R36D/K38E (noté RACK1^{DE}) a été décrit comme incapable de lier le ribosome dans des cellules 293T et des cellules HT1080 dérivées de fibrosarcome humain (Kim *et al.*, 2017).

La forme ribosomique de RACK1 étant nécessaire à la traduction IRES-dépendante de plusieurs virus et étant également impliquée dans la prolifération et la chimiorésistance du CHC, inhiber l'interaction entre RACK1 et le ribosome pourrait permettre le développement d'une nouvelle solution thérapeutique dans le traitement d'infections virales variées et de différents cancers. Nous avons voulu mettre en place un modèle cellulaire exprimant le double mutant de RACK1 afin de servir de base à l'étude de petites molécules inhibant l'interaction entre RACK1 et le ribosome et pouvant mener au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le cas de l'infection par le HCV, ainsi que pour d'autres virus dont la traduction dépend d'un IRES, ainsi que pour les patients atteints de CHC.

a. Établissement d'une lignée Huh7 RACK1^{KO}

Dans un premier temps, j'ai voulu établir une lignée Huh7 n'exprimant plus RACK1 à l'aide de la technologie CRISPR-Cas9. Pour cela, j'ai produit des lentivirus exprimant un sgARN

Résultats – Partie I

ciblant *RACK1*. Des cellules Huh7 surexprimant Cas9, appelées Huh7-Cas9, ont été transduites avec les lentivirus produits. Après une semaine de sélection des cellules transduites, la perte de l'expression de *RACK1* a été vérifiée par western blot (**Figure 54A**). Le KO de *RACK1* a également été vérifié de manière fonctionnelle par infection des cellules par HCV. La perte de l'expression de *RACK1* induit diminution de 90 % de la réplication virale comparée aux cellules

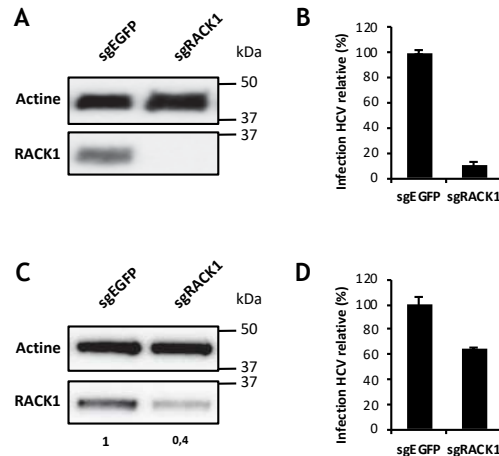


Figure 54. Étude de la lignée Huh7-Cas9 *RACK1*^{KO}. Des cellules Huh7 surexprimant Cas9 (Huh7-Cas9) ont été transduites avec un lentivirus exprimant un sgARN ciblant *RACK1* (*sgRACK1*) ou un sgARN ciblant l'*EGFP* (*sgEGFP*) comme contrôle. Les cellules transduites ont été sélectionnées par ajout d'hygromycine (250 µg/ml) dans le milieu de culture. (**A-B**) Après une semaine, les cellules ont été transfectées par électroporation avec de l'ARN HCV JcR2A afin de les infecter. Après 48 heures, l'expression de *RACK1* a été vérifiée par western blot (**A**) et l'infection virale a été quantifiée par mesure de l'activité luciférase (**B**). (**C-D**) La même expérience d'infection a été réalisée une semaine plus tard. Les cellules ont été infectées pendant 48 heures puis l'expression de *RACK1* a été vérifiée par western blot (**C**) et l'infection virale a été quantifiée par mesure de l'activité luciférase (**D**). **C** L'intensité de la bande de *RACK1* a été normalisée par rapport à l'actine et la valeur relative est indiquée. Une expérience représentative a été réalisée. **B** et **D** Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SEM de l'infection relative par le HCV à partir d'une expérience représentative ($n=3$).

transduites avec *sgEGFP* (**Figure 54B**). Les cellules ont été cultivées pendant une semaine puis ont été à nouveau infectées par HCV et dans ce cas nous avons observé une activité répliquative à hauteur de 65 % dans les lignées *RACK1*^{KO} comparée à la lignée transduite avec *sgEGFP* due à la réexpression de *RACK1* observée par western blot dans les cellules exprimant les sgARN ciblant *RACK1*, bien que cette expression soit plus faible de 60 % que dans les cellules exprimant un sgARN contrôle (**Figure 54C-D**). Ces résultats montrent que le KO *RACK1* n'était pas total. Afin de palier à ce problème, j'ai fait une sélection clonale à partir des deux lignées cellulaires exprimant les sgARN ciblant *RACK1*. Malheureusement, plus de 50 clones ont été isolés et après 2 mois, toutes les lignées sélectionnées exprimaient *RACK1* à un taux équivalent aux cellules contrôle. Cette observation suggère fortement que le KO de *RACK1* n'est pas viable dans les cellules Huh7.

b. Établissement d'une lignée Huh7 exprimant RACK1^{DE}

Pour l'obtention d'une lignée Huh7 RACK1^{KO} nous avons alors opté pour une autre stratégie pour mettre en place un modèle cellulaire exprimant le mutant RACK1^{DE} de manière

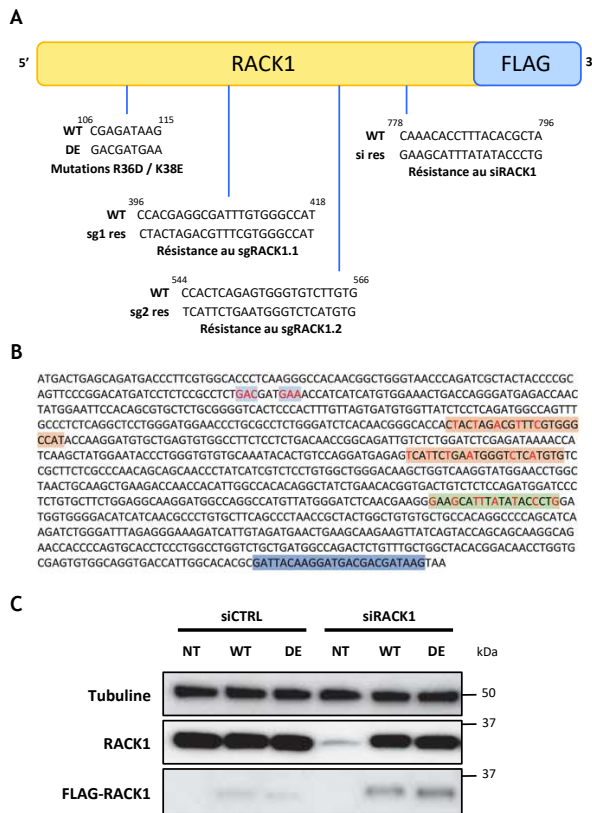


Figure 55. Mise en place d'une lignée Huh7 exprimant RACK1^{WT} et RACK1^{DE}. (A-B) Les mutations apportées à la séquence originale de RACK1 et la séquence clonée dans le plasmide exprimant RACK1^{DE} est représentée. La séquence clonée dans le plasmide exprimant RACK1^{WT} est identique à l'exception des mutations R36D / K38E. Les nucléotides permettant les mutations R36D et K38E sont surlignés en gris. Les séquences cibles des deux sgARN ciblant RACK1 sont surlignées en orange. La séquence cible du siARN ciblant RACK1 est surlignée en vert. La séquence de FLAG est surlignée en bleu. Les nucléotides mutés par rapports à la séquence d'origine de RACK1 sont marqués en rouge. (C) Des cellules Huh7 ont été transduites avec des lentivirus exprimant la version sauvage (WT) ou mutée (DE) de RACK1. Les cellules transduites ont été sélectionnées à la puromycine (1,8 µg/ml) pendant une semaine. Les cellules ont ensuite été transfectées avec un siARN ciblant l'expression de RACK1 (siRACK1) ou un siARN contrôle (siCTRL). Après 72 heures, l'expression de totale RACK1 et l'expression de la protéine RACK1 contenant FLAG ont été observées par western blot. Une expérience représentative a été réalisée.

stable. Nous avons produit deux séquences de RACK1, l'une contenant les acides aminés R36 et K38 (RACK1^{WT}) et l'autre contenant les mutations R36D et K38E. Ces séquences possèdent également des mutations silencieuses leur conférant une résistance au siARN et aux sgARN ciblant RACK1. Afin de pouvoir détecter l'expression exogène de RACK1 par western blot, une étiquette FLAG a été ajoutée afin d'être exprimée à l'extrémité C-terminale des formes WT et mutante de RACK1 (Figure 55A-B). Ces séquences ont été clonées par la technique Gibson dans un plasmide permettant la production de lentivirus puis des cellules Huh7 ont été transduites par les lentivirus produits. Après une semaine de sélection, les cellules ont été transfectées avec un siARN ciblant RACK1 ou un siARN contrôle. Après 3 jours, l'expression de RACK1 endogène et exogène ainsi que l'expression exogène de RACK1, étiquetée par un épitope FLAG, ont été détectées par western blot (Figure 55C). Dans les cellules non-transduites la transfection du siRACK1 induit une baisse de l'expression de RACK1 comme attendu. En revanche, les cellules transduites montrent une expression de RACK1 comparable au contrôle, confirmant

Résultats – Partie I

la résistance des séquences exogènes au siARN (**Figure 55C**). De manière surprenante, les cellules transduites, transfectées avec le siCTRL ne montrent pas de surexpression de RACK1 comparé aux cellules non transduites. De plus, l'expression exogène de RACK1 détectée par l'étiquette FLAG est augmentée lorsque l'expression endogène de RACK1 est diminuée par ARN interférence (**Figure 55C**). Il est possible que la régulation de la transcription ou de la stabilité de l'ARNm de RACK1 soit hautement régulée dans la cellule par l'activation de facteurs de transcription ou par des miR. Ceci expliquerait l'absence de surexpression de RACK1 observée et pourrait expliquer pourquoi en l'absence de *silencing*, l'expression endogène de RACK1 est favorisée.

La même expérience a été réalisée en utilisant la lignée Huh7-Cas9. Cependant, la protéine Cas9 possédant également une étiquette FLAG dans ce modèle, un bruit de fond conséquent est observé lors de la détection de l'étiquette par western blot rendant difficile la visualisation de l'expression exogène de RACK1.

Les lignées Huh7-Cas9 exprimant RACK1^{WT} ou RACK1^{DE} ont été transduites par des lentivirus exprimant les sgARN ciblant *RACK1* afin d'invalider le gène *RACK1* endogène. Après une semaine de sélection, les lignées produites ont été infectées pendant 48 heures par HCV afin de valider les modèles produits de manière fonctionnelle, les lignées exprimant RACK1^{DE} ne devant plus être sensibles à l'infection par HCV (**Figure 56A**). L'expression totale de RACK1 ainsi que l'expression exogène de RACK1 ont été détectées par western blot (**Figure 56B**). La détection par l'anticorps ciblant RACK1 a montré une forte expression de RACK1 dans ces lignées. La détection de l'étiquette FLAG montre une expression exogène de RACK1, bien que le bruit de fond rende difficile l'estimation de la force de l'expression (**Figure 56B**). La

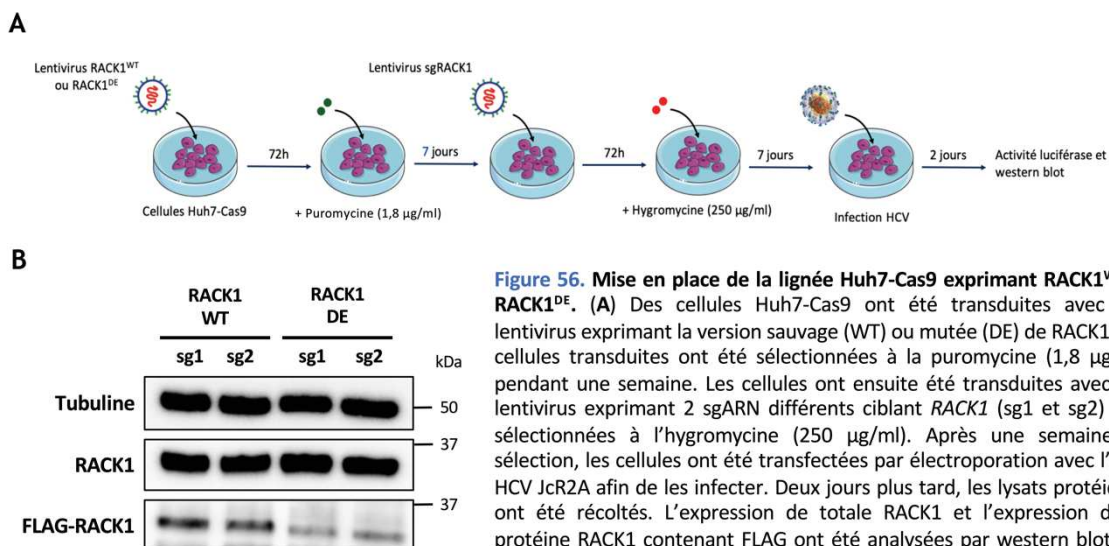


Figure 56. Mise en place de la lignée Huh7-Cas9 exprimant RACK1^{WT} et RACK1^{DE}. (A) Des cellules Huh7-Cas9 ont été transduites avec des lentivirus exprimant la version sauvage (WT) ou mutée (DE) de RACK1. Les cellules transduites ont été sélectionnées à la puromycine (1,8 µg/ml) pendant une semaine. Les cellules ont ensuite été transduites avec des lentivirus exprimant 2 sgARN différents ciblant *RACK1* (sg1 et sg2) puis sélectionnées à l'hygromycine (250 µg/ml). Après une semaine de sélection, les cellules ont été transfectées par électroporation avec l'ARN HCV JcR2A afin de les infecter. Deux jours plus tard, les lysats protéiques ont été récoltés. L'expression de totale RACK1 et l'expression de la protéine RACK1 contenant FLAG ont été analysées par western blot (B). Une seule expérience représentative a été réalisée

détection de l'activité luciférase a cependant montré une réplication virale active dans toutes les lignées. La susceptibilité à l'infection par le HCV de la lignée transduite avec le mutant peut provenir (1) d'une mauvaise invalidation de l'expression endogène de RACK1 ou (2) d'une capacité toujours présente de RACK1^{DE} à interagir avec le ribosome.

III. Discussion

Les virus hépatiques chroniques HCV, HBV et HDV sont responsables de la majorité des maladies hépatiques et des CHC et représentent un problème de santé publique majeur. Pour ces trois virus, les recherches ont pendant longtemps été freinées par le manque de modèle d'étude robuste et facile d'utilisation. Au début des années 2000, l'isolement d'une lignée Huh7.5 plus permissive à la réplication du HCV (Blight *et al.*, 2002) puis l'isolement d'un virus HCV à partir d'un patient atteint d'hépatite fulminante ayant permis la mise en place d'un système réplicon (Kato *et al.*, 2003) ont été la pierre angulaire du début des études des interactions entre le HCV et son hôte. Ces modèles d'étude comportent différents avantages permettant l'étude approfondie des interactions entre les virus hépatiques et leur hôte.

1. RACK1 et l'inflammation hépatique

La découverte des traitements basés sur des DAA contre l'infection par le HCV permet aujourd'hui d'atteindre une RVS supérieure à 95 % chez les patients traités. Cependant, le coût de ces traitements rend leur accessibilité moindre et plusieurs apparitions de résistances ont déjà été décrites (Crouchet *et al.*, 2018). Depuis quelques années, le concept de traitement ciblant une protéine de l'hôte nécessaire au cycle viral, dit HTA, a pris de l'ampleur, notamment par la découverte du Maraviroc dans le traitement de l'infection par le HIV (Dorr *et al.*, 2005). Néanmoins, la découverte de HTA nécessite en amont l'étude des interactions entre le virus et son hôte afin de découvrir de nouveaux facteurs d'hôte qui seront alors la cible d'un traitement. En 2014, une étude publiée par mon laboratoire d'accueil a montré l'importance de RACK1 dans la traduction IRES-dépendante du HCV (Majzoub *et al.*, 2014). RACK1 est une protéine ubiquitaire également impliquée dans la régulation de nombreuses voies de signalisation dans lesquelles elle joue le rôle de protéine d'échafaudage permettant l'assemblage de complexes d'activation ou à l'inverse la stabilisation de complexes d'inhibition (Adams *et al.*, 2011). Son implication majeure dans le cycle viral du HCV a soulevé l'hypothèse que l'infection par le HCV pourrait détourner RACK1 de ses fonctions au profit de

l'infection virale et engendrerait des perturbations de la régulation de voies de signalisation, dont les voies de l'immunité innée et de l'inflammation. Afin d'étudier l'impact d'un détournement de RACK1 par le HCV sur l'inflammation hépatique, j'ai dans un premier temps étudié l'effet de la diminution de l'expression de RACK1 par ARN interférence dans des cellules Huh7.

La chimiokine IP-10 est majoritairement retrouvée dans le plasma de patients infectés par HCV et sa concentration est corrélée avec la charge virale et la progression de la maladie hépatique (Reiberger *et al.*, 2008). Dans un premier temps, j'ai observé que la diminution de l'expression de RACK1 dans notre modèle induit une augmentation de l'expression et de la sécrétion d'IP-10 (**Figure 35**). Cette observation a également été confirmée en modèle PHH (**Figure 36**). J'ai ensuite pu montrer que la surexpression d'IP-10 n'est pas due à la production d'une cytokine dans le surnageant de culture qui activerait ensuite une voie de signalisation (**Figure 37**). La surexpression d'IP-10 lors de la diminution de RACK1 est donc liée à un évènement intracellulaire.

Par la suite, j'ai voulu identifier la voie de signalisation impliquée dans la surexpression d'IP-10 dans ces conditions. L'étude de différentes voies de signalisation a permis d'écarter une activation de STAT1 (**Figure 39**). J'ai cependant observé que la diminution de l'expression de RACK1 induit une surexpression et une suractivation de c-Jun dans les cellules Huh7 (**Figure 42**). Ces résultats vont à l'encontre de différentes publications mettant en évidence un rôle positif de RACK1 dans l'activation de JNK, la kinase impliquée dans la phosphorylation de c-Jun, et dans la stabilisation de c-Jun afin d'inhiber sa dégradation par le protéasome (Gandin *et al.*, 2013; López-Bergami *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2015). En PHH en revanche, bien qu'une légère augmentation de l'expression de c-Jun ait été observée, celle-ci reste à confirmer par répétition d'expérience (**Figure 44A-B**). Dans la lignée cellulaire HepG2, la diminution de l'expression de RACK1 induit l'augmentation de l'expression de c-Jun (**Figure 50A-B**). Cependant, aucune suractivation de c-Jun n'a été observée (**Figure 50A**). De plus, aucune induction de l'expression d'IP-10 n'a été détectée dans ce modèle. Enfin, la diminution de l'expression de RACK1 dans des cellules Huh7.5.1 induit une suractivation de c-Jun et une surexpression d'IP-10 (**Figure 49A-C**), cependant la surexpression d'IP-10 observée est environ 5 fois plus faible que celle observée en Huh7. L'une des différences majeures entre les lignées

Huh7 et Huh7.5.1 étant une mutation de RIG-I présente dans les cellules Huh7.5.1 (Sumpter *et al.*, 2005), la surexpression d'IP-10 lors du *silencing* de RACK1 pourrait au moins en partie être due à l'activation de RIG-I dans les cellules Huh7. J'ai également observé une augmentation de la transcription de p65 en cellules Huh7 lors de la diminution de l'expression de RACK1 (**Figure 43A**), ainsi qu'une augmentation de la relocalisation nucléaire de p65 (**Figure 40**), reflétant son activation. Ces résultats restent cependant à confirmer par des expériences supplémentaires.

Afin d'approfondir les recherches sur l'implication de c-Jun, p65 et RIG-I dans la surexpression d'IP-10 lors de la diminution de l'expression de RACK1, je propose d'établir des lignées cellulaires ayant perdu l'expression de ces facteurs de transcription grâce à la technologie CRISPR-Cas9. La diminution de l'expression de RACK1 puis la mesure de l'expression d'IP-10 dans ces différentes lignées permettra de préciser l'implication de chacun de ces facteurs de transcription dans la surexpression d'IP-10. Ces modèles permettront d'identifier si la surexpression d'IP-10 est liée à différentes voies de signalisation indépendantes ou non. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des voies identifiées pourra ensuite permettre d'affiner la recherche du mécanisme impliqué dans cette surexpression. De plus, le rôle de RIG-I dans la surexpression d'IP-10 pourrait être confirmé en surexprimant la version non mutée de RIG-I dans ces cellules Huh7.5.1, puis en diminuant l'expression de RACK1 et en mesurant l'expression d'IP-10.

Durant mes travaux, j'ai également analysé si la diminution de l'expression de RACK1 induit un stress pouvant être responsable de la surexpression de c-Jun et d'IP-10. Dans les hépatocytes, l'expression de c-Jun est induite lors d'un stress du RE afin de protéger les cellules contre l'apoptose (Fuest *et al.*, 2012). Cependant, aucune activation du stress du RE, observée par l'épissage de l'ARNm de *XBP1*, n'a été observée lors de la diminution de l'expression de RACK1 (**Figure 46B**).

Lorsqu'elle est phosphorylée sur la thréonine 50, RACK1 se détache du ribosome et active la traduction de Beclin-1 (Li Xiang *et al.*, 2019). Elle se lie également au complexe formé par Beclin-1 afin d'induire l'autophagie et la diminution de l'expression hépatique de RACK1 en modèle murin induit une perte de l'activation de l'autophagie et une accumulation d'acides gras intracellulaires provoquant l'apparition spontanée de tumeurs (Zhao *et al.*, 2015). J'ai

testé si la diminution de l'expression de RACK1 induit une accumulation de lipides neutres dans les cellules Huh7 cependant aucune accumulation n'a été observée (**Figure 47A**).

La voie de l'EGFR est activée lors de l'infection par HCV et l'inhibition de l'activation d'EGFR inhibe l'entrée du HCV (Groegger *et al.*, 2018; Lupberger *et al.*, 2011; Suarez *et al.*, 2018). Par ailleurs, dans un modèle d'hépatocytes de rat, la stimulation de EGFR induit la phosphorylation de c-Jun par activation de JNK (Wang *et al.*, 2008). Afin d'observer si la surexpression d'IP-10 est due à une activation de EGFR, j'ai traité des cellules Huh7 dépletées de RACK1 avec de l'erlotinib, un inhibiteur spécifique de cette voie. Cependant, le traitement à l'erlotinib n'a induit aucune diminution de l'expression d'IP-10 lors de la diminution de l'expression de RACK1 (**Figure 48**) indiquant que cette voie n'est pas impliquée dans la surexpression d'IP-10.

Afin d'avoir une idée plus globale de l'impact de la diminution de l'expression de RACK1 sur l'inflammation hépatique, j'ai réalisé une comparaison transcriptomique entre des cellules naïves et des cellules dépletées de RACK1. L'analyse individuelle de gènes a montré la surexpression de gènes impliqués dans les voies RIG-I et NF- κ B (**Figure 51**). L'étude du rôle des différents gènes identifiés a montré que les gènes impliqués dans la voie de signalisation RIG-I sont des gènes impliqués dans la transduction du signal suite à l'activation de RIG-I. De manière similaire, la plupart des gènes surexprimés identifiés appartenant à la voie NF- κ B sont des activateurs de la voie. TANK et la kinase interagissant avec elle, TBK1, ainsi que deux sous-unités du complexe IKK, IKBKE et IKBKG, ont été identifiées et participent à la phosphorylation de I κ B et sa dégradation par le protéasome, permettant l'activation de p50/p65 et leur translocation dans le noyau afin d'induire l'expression d'ISG. Cependant, deux inhibiteurs de la voie NF- κ B, dont une sous-unité du complexe I κ B, NFKBIA, et NKRF sont également surexprimés dans ces conditions (**Figure 51**). La surexpression d'activateurs et d'inhibiteurs de la voie NF- κ B pourrait indiquer une activation régulée par un rétro-contrôle négatif de la voie. IKBKE et TBK1 font partie de la famille des IKK mais sont des protéines non-canoniques de cette famille. Ces protéines sont surexprimées dans le cancer du poumon non à petites cellules et contribuent à la survie cellulaire de manière indépendante à l'activation de NF- κ B (Kim *et al.*, 2013). Dans un modèle de culture cellulaire, il a été également montré que, l'inhibition

par NS3/4A de la voie de signalisation induite par RIG-I, peut être restaurée par la surexpression d'IKBKE menant alors à l'expression d'IFN- β (Breiman *et al.*, 2005).

Pour confirmer l'importance des différents activateurs des voies RIG-I et NF- κ B dans l'activation et c-Jun et/ou la surexpression d'IP-10, un mini criblage par perte de fonction utilisant la technologie CRISPR-Cas9 peut être envisagé afin d'éteindre l'expression des différents acteurs identifiés puis de diminuer l'expression de RACK1 par ARN interférence. L'étude de l'expression d'IP-10 et de c-Jun ainsi que de son activation permettra de définir quels facteurs sont impliqués et d'orienter les recherches afin de découvrir le mécanisme fin de régulation impliquant RACK1.

L'hypothèse de départ étant de savoir si l'infection par le HCV induit un détournement de RACK1 afin de subvenir à la traduction virale, j'ai analysé l'impact de l'infection par le HCV sur l'expression de RACK1 et d'IP-10 ainsi que sur l'activation de c-Jun en culture cellulaire. J'ai pu observer, dans deux modèles cellulaires différents, que l'infection par le HCV induit une diminution de l'expression de RACK1 (**Figure 34 A et C**). De plus, l'infection par le HCV induit une surexpression d'IP-10 (**Figure 34B**) et une suractivation de c-Jun (**Figure 34C**). Ces résultats nécessitent cependant d'être reproduits et approfondis. Les données transcriptomiques obtenues ont été analysées par GSEA afin d'identifier si la diminution de l'expression de RACK1 induit la surexpression ou la diminution de l'expression de groupes de gènes appartenant à une fonction ou une voie commune. De manière étonnante, j'ai observé que le *silencing* de RACK1 induit la diminution de l'expression d'un grand nombre de protéines ribosomiques (**Figure 50A**). Ceci pourrait induire des perturbations dans la physiologie cellulaire et souligne le fait que cibler globalement l'expression de RACK1 dans le cadre d'une thérapie pourrait être délétère.

L'un des groupes de gènes surexprimés lors du *silencing* de RACK1 correspond à un groupe annoté comme étant induit par une réponse à l'IFN- α (**Figure 52B**). Il est à noter que la majeure partie de ces gènes ne sont pas spécifiques de cette voie et peut être également induit par d'autres voies de l'immunité innée ou inflammatoire. Afin de déterminer si le schéma de surexpression de gènes observés lors du *silencing* de RACK1 pouvait être retrouvé lors d'une infection par le HCV, j'ai analysé l'expression des 30 gènes les plus surexprimés du groupe « IFN- α » à partir des données de transcriptomiques obtenues à partir de patients infectés de manière chronique par le HCV précédemment publiées (Boldanova *et al.*, 2017).

Sur les 30 gènes analysés, 21 sont fortement surexprimés chez les patients infectés par le HCV (**Figure 53**). De plus, l'expression de RACK1 est également diminuée de manière significative chez ces patients (**Figure 33**). Bien que la réponse immunitaire induite par le virus chez les patients puisse expliquer la surexpression de ces gènes, la diminution de l'expression de RACK1 pourrait exacerber cette expression et empêcher un rétro-contrôle négatif ce qui pourrait participer à l'inflammation chronique observée chez les patients et serait responsable de la progression vers le CHC. Afin d'étudier le rôle de RACK1 dans le maintien de la réponse inflammatoire chronique chez les patients infectés par le HCV, il serait intéressant de surexprimer RACK1 dans des PHH issus de patients infectés afin d'observer si la surexpression de RACK1 induit une diminution de l'inflammation. Le microenvironnement hépatique étant également important dans le maintien de la réponse inflammatoire lors de l'infection, il serait également envisageable de produire des sphéroïdes à partir de résections hépatiques issues de patients ou de souris infectés par le HCV. RACK1 pourrait ensuite être surexprimée spécifiquement dans les hépatocytes à l'aide d'un vecteur viral permettant l'expression de RACK1 sous la dépendance d'un promoteur hépato-spécifique (Kattenhorn *et al.*, 2016).

2. RACK1 et le ribosome

L'interaction de RACK1 avec le ribosome est nécessaire à la traduction IRES-dépendante du HCV (Majzoub *et al.*, 2014) et participe à la croissance et à la chimiorésistance du CHC (Ruan *et al.*, 2012). Les résultats obtenus dans la première partie, en particulier les données de transcriptomique, montrent que cibler l'expression de RACK1 peut être délétère pour la cellule en induisant une inflammation chronique et en diminuant l'expression d'un nombre conséquent de protéines ribosomiques. Un mutant de RACK1, nommé RACK1^{DE}, a été plusieurs fois décrit comme étant incapable de se lier au ribosome. Afin d'identifier une molécule permettant d'inhiber l'interaction de RACK1 avec le ribosome, j'ai voulu produire un modèle cellulaire dont l'expression endogène de RACK1 est invalidée par CRISPR-Cas9 et compensée par un vecteur lentiviral exprimant le mutant RACK1^{DE}.

Dans un premier temps, j'ai essayé d'obtenir une lignée Huh7 RACK1^{KO}. Cependant, bien que le KO puisse être produit, RACK1 était à nouveau détectée au cours du temps (**Figure 54**). RACK1 étant impliquée dans la croissance du CHC et notre modèle étant basé sur des cellules provenant de CHC, il est possible que les cellules ayant perdu l'expression de RACK1

ne croissent plus et soient petit à petit remplacées par les cellules n'ayant pas été éditées ou des cellules dans lesquelles l'édition n'a pas induit de perte d'expression.

Afin de pallier ce problème, j'ai ensuite produit des lignées Huh7 exprimant RACK1^{WT} ou RACK1^{DE} à partir d'une séquence résistante au *silencing* et au KO CRISPR-Cas9 clonée dans un vecteur lentiviral. L'analyse de l'expression de RACK1 à partir des vecteurs lentiviraux a été réalisée en diminuant l'expression endogène de RACK1 par ARN interférence (Figure 55C). Les cellules ont ensuite été transduites avec des vecteurs lentiviraux exprimant des sgARN ciblant RACK1 afin d'induire un KO de l'expression endogène de RACK1. Cependant, l'infection par HCV de ces cellules a montré une infection comparable en présence de RACK1^{WT} et de RACK1^{DE}. Plusieurs vérifications restent à faire afin de comprendre ce résultat. Par western blot, il n'est pas possible de discriminer entre l'expression endogène et exogène de RACK1 et, de ce fait, il n'est pas possible de vérifier l'efficacité de la perte d'expression de la protéine endogène. D'après la littérature, le mutant RACK1^{DE} ne se lie plus au ribosome (Coyle *et al.*, 2009; Majzoub *et al.*, 2014; Ruan *et al.*, 2012). Il serait important de vérifier la perte de liaison au ribosome du mutant RACK1^{DE} dans mon modèle. Pour cela, je souhaite faire un profilage ribosomique sur les deux lignées cellulaires exprimant RACK1^{WT} et RACK1^{DE}. La détection, dans les différentes fractions ribosomiques, de RACK1 à l'aide d'anticorps ciblant RACK1 et l'étiquette FLAG permettra de définir : (1) si le mutant RACK1^{DE} est retrouvé au niveau du ribosome par détection de l'étiquette FLAG dans les fractions ribosomiques et (2) si l'expression endogène de RACK1 est éteinte ou non, car, si le mutant RACK1^{DE} n'est pas retrouvé au ribosome, la détection de RACK1 par l'anticorps ciblant RACK1 signifierait que l'expression endogène de RACK1 n'est pas éteinte. Si le modèle exprimant RACK1^{DE} ne permet pas de perte de la localisation ribosomique de RACK1, un autre modèle devra être envisagé.

Deux articles ont décrit que la phosphorylation de RACK1 sur la thréonine 50 par AMPK induit son détachement du ribosome afin notamment d'induire l'autophagie (Li Xiang *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2015). L'expression d'un mutant phospho-mimétique en remplaçant la thréonine 50 par un acide aspartique pourrait permettre d'empêcher l'interaction de RACK1 avec le ribosome. Cependant, cette phosphorylation étant impliquée dans la régulation de processus cellulaires, dont l'autophagie, différents effets sur la physiologie cellulaire sont à prendre en compte.

A terme, le modèle dans lequel RACK1 n'est plus capable de se lier au ribosome devait servir de contrôle pour un criblage cellulaire, à l'aide d'une banque de petites molécules, dans

Résultats – Partie I

le but d'inhiber l'interaction de RACK1 avec le ribosome tout en préservant ses autres fonctions cellulaires. Les intérêts de l'inhibition de l'interaction entre RACK1 et le ribosome sont multiples et permettraient (1) de traiter différentes infections virales humaines (HCV, EMCV,...) mais également animales (Pestivirus) nécessitant cette interaction pour leur traduction IRES-dépendante et (2) de servir de complément de traitement dans les cancers, dont le CHC, où la présence de RACK1 au ribosome favorise la croissance cellulaire et la chimiorésistance (Ruan *et al.*, 2012).

Résultats

Partie II : Découverte et caractérisation de facteurs d'hôtes du HDV issus d'un criblage par perte-de-fonction

Le projet d'étude de RACK1 progressant difficilement, j'ai rejoint le groupe du Dr. Eloi Verrier spécialisé dans les interactions entre les virus HBV et HDV et leur hôte cellulaire, au cours de ma 2^{ème} année de doctorat.

I. Introduction

Le HDV est un virus satellite du HBV. La co-infection du HDV avec le HBV ou la surinfection d'hépatocytes déjà infectés par le HBV entraîne une accélération et une aggravation de la maladie hépatique comparées aux patients uniquement infectés par le HBV et en fait la forme la plus sévère d'hépatite virale (Sureau & Negro, 2016). Bien que les estimations épidémiologiques varient, il est estimé qu'entre 5 et 10 % des patients HBV sont co-infectés avec le HDV (Chen *et al.*, 2018; Miao *et al.*, 2019). Les traitements actuels basés sur l'IFN- α pégylé n'entraînent une élimination du virus que dans de très rares cas et sont donc très peu satisfaisants (Hughes *et al.*, 2011). Le génome du HDV ne contient qu'une seule ORF codant l'antigène delta HDAg retrouvé sous ses formes courte S-HDAg et longue L-HDAg. Aucune des deux formes de HDAg ne possède de fonction enzymatique ce qui empêche le développement de DAA contre le HDV. En revanche, le HDV est très fortement dépendant de son hôte pour les différentes étapes de son cycle viral. De ce fait, l'étude des interactions entre le HDV et son hôte pourrait permettre la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques.

Le HBV et le HDV partagent les mêmes glycoprotéines virales d'enveloppe et ils partagent de ce fait le même récepteur d'entrée, NTCP, et la même voie d'entrée (Ni *et al.*, 2014). Depuis plusieurs années, la caractérisation d'un peptide myristoylé dérivé de la région préS1 de L-AgHBs a permis le développement d'un traitement, le Bulevirtide, encore en essai clinique et possédant depuis quelques mois une autorisation d'utilisation temporaire exceptionnelle en France dans le traitement de certains patients infectés par HDV (<https://www.ansm.sante.fr/Activites/Autorisations-temporaires-d-utilisation-ATU/ATU-de-cohorte-en-cours/Liste-des-ATU-de-cohorte-en-cours/BULEVIRTIDE-2-mg-poudre-pour-solution-injectable>). L'étude des interactions entre le HDV et son hôte a également permis la découverte d'autres molécules, comme le Lonafarnib et REP-2139, actuellement étudiés en essai clinique (Bazinet *et al.*, 2019; Koh *et al.*, 2017). Bien que beaucoup de molécules soient testées en essai clinique, la majorité d'entre elles ne passeront pas toutes les phases et leur développement sera arrêté. De plus, le pouvoir antiviral d'une molécule seule n'est parfois

pas suffisant et l'utilisation d'une combinaison de molécules est souvent plus efficace et permet de réduire les doses des différentes molécules et de ce fait les effets secondaires. Enfin, l'apparition de résistances à un traitement est également à prendre en compte ce qui le rendrait inutilisable. En conséquence, il est important de continuer à chercher de nouvelles molécules antivirales afin d'agrandir le panel de traitements disponibles et de pouvoir traiter au mieux les patients.

La thématique du groupe portant sur l'étude des interactions entre le HBV et le HDV et leur hôte, je me suis familiarisé avec les techniques employées en participant à la révision d'un article scientifique publié dans la revue *Hepatology* en 2018 (voir annexe ; (Verrier *et al.*, 2018)).

Par la suite, le groupe a réalisé un criblage par perte-de-fonction dans le but d'identifier des facteurs d'hôte impliqués dans le cycle viral du HDV. Parmi les 7568 gènes testés, 191 candidats ont été retenus en fonction de leur effet sur l'infection par le HDV, de leur toxicité et de leur expression dans le foie. Deux candidats, CAD (*carbamoyl-phosphatesynthetase 2, aspartate transcarbamylase & dihydroorotase*) et ESR1 (*Estrogen receptor 1*), ont été validés. De plus, le pouvoir antiviral et la cytotoxicité du PALA (acide N-(phosphonoacetyl)-L-aspartique), un inhibiteur de CAD, ont été caractérisés. Dans ce projet, qui a fait l'objet d'un article scientifique publié dans *Gut* en 2020 (voir annexe ; (Verrier *et al.*, 2020)), j'ai participé à la validation et à la caractérisation de CAD comme facteur d'hôte du HDV ainsi qu'à la caractérisation du pouvoir antiviral du PALA. J'ai par la suite mis en place une lignée CAD^{KO} grâce à la technologie CRISPR-Cas9 dans le but de valider plus en détails le rôle de CAD dans l'infection par HDV. A la suite de ces travaux, j'ai réalisé un petit criblage par perte-de-fonction en sélectionnant 10 gènes faisant partie de la famille des protéines transmembranaires SLC (*Solute carrier family member*). Le criblage a été réalisé sur les modèles d'infection HDV et HBV établis au laboratoire dans le but de découvrir de nouveaux facteurs impliqués dans l'entrée de ces deux virus.

II. Résultats

1. Validation de CAD comme facteur d'hôte du HDV

Lors du criblage réalisé, les siARN utilisés constituaient un assemblage de 4 siARN de séquence différente ciblant le même gène. Afin de valider la spécificité d'action des siARN, j'ai réalisé une déconvolution des siARN en transfectant des cellules Huh106 avec les siARN individuels ciblant *CAD* (siCAD#1-4) ou avec l'assemblage des 4 siARN (siCAD pool). Après 2 jours, l'efficacité de perte d'expression de *CAD* a été observée par western blot (Figure 57A). Les cellules ont ensuite été infectées par HDV pendant 7 jours et l'infection virale a été évaluée par RT-qPCR (Figure 57B). Les résultats obtenus montrent une diminution de l'infection de l'ordre de 80 % pour les différents siARN confirmant l'importance de *CAD* dans le cycle du HDV. De plus, l'infection virale a également été observée par immunofluorescence sur des cellules transfectées avec siCAD pool ou un siARN contrôle (siCtrl) (Figure 57C).

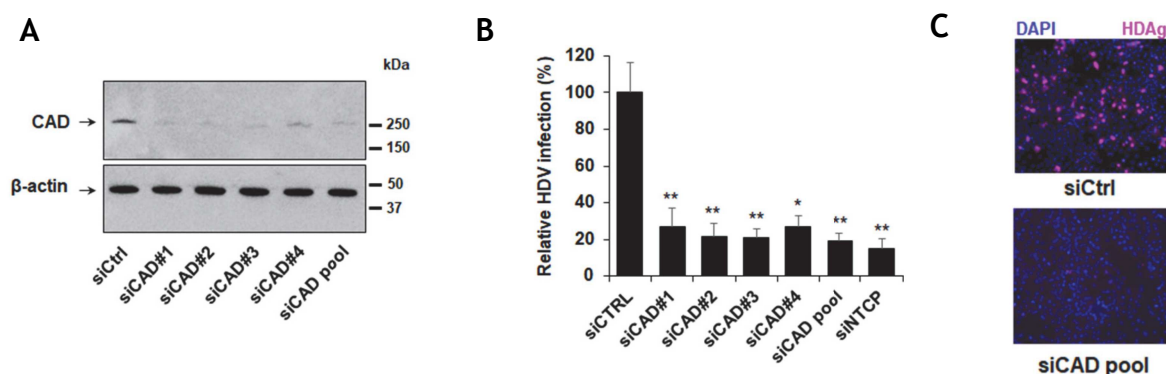


Figure 57. Validation de CAD comme facteur d'hôte de l'infection par HDV. Des cellules Huh106 ont été transfectées avec quatre siARN individuels ciblant *CAD* ou avec l'ensemble de ces quatre siARN (siCAD pool). L'efficacité de diminution de l'expression de *CAD* a été observée par western blot 48 heures post-transfection (A). Une seule expérience représentative est montrée. Les cellules ont été infectées par HDV pendant 7 jours et l'infection virale a été mesurée par RT-qPCR (B). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SEM de l'infection relative par le HDV comparée à la condition siCtrl à partir de trois expériences indépendantes ($n=8$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (test U de Mann-Whitney bilatéral) (B) En parallèle, l'infection HDV a également été détectée par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps anti-HDAg dérivé de patient. (C) Une expérience représentative utilisant siCAD pool est montrée. (adapté de Verrier *et al.*, 2020).

2. Caractérisation du pouvoir antiviral du PALA

Le PALA, ou acide sparfosique, est un inhibiteur de l'activité aspartate carbamoyltransférase de *CAD*. Le pouvoir antiviral du PALA a été évalué sur nos modèles d'infection HDV en cellules Huh106 et en PHH. Les cellules ont été cultivées en présence de PALA à trois concentrations différentes (1, 5 et 10 μM pour les Huh106 ; 1, 10 et 100 μM pour les PHH) 24 heures avant infection. Les cellules ont ensuite été infectées par HDV puis

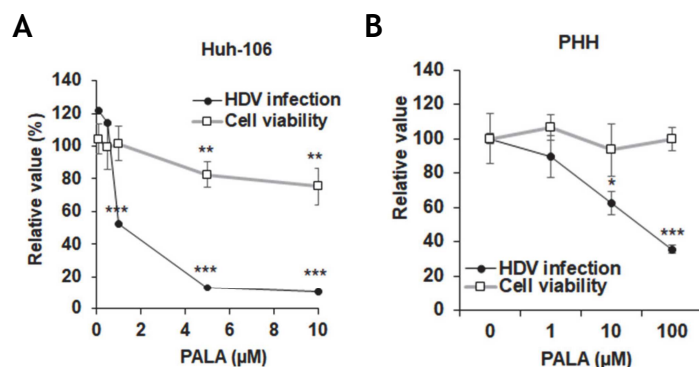


Figure 58. PALA, un inhibiteur de CAD, inhibe l'infection HDV de manière dose-dépendante. Des cellules Huh106 (A) et des PHH (B) ont été traitées avec différentes concentrations de PALA pendant 24 heures avant d'être infectées par HDV. Les cellules ont ensuite été cultivées pendant 7 jours en présence de PALA. La viabilité cellulaire a été mesurée par PrestoBlue et l'infection HDV a été mesurée par RT-qPCR. (A) Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- écart type de l'infection relative par le HDV ou de la viabilité cellulaire comparée aux cellules non-traitées (0, définie à 100 %) à partir de trois expériences indépendantes ($n=9$). (B) Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SEM de l'infection relative par le HDV ou de la viabilité cellulaire comparée aux cellules non-traitées (0, définie à 100 %) à partir de trois expériences indépendantes ($n=8$). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (test U de Mann-Whitney bilatéral) (adapté de Verrier *et al.*, 2020).

cultivées pendant 7 jours en présence de PALA. En Huh106, le PALA inhibe l'infection virale de manière dose-dépendante avec une IC_{50} de 1,2 µM et induit une perte de viabilité cellulaire de 20 % pour les plus fortes concentrations (Figure

58A). En PHH, une inhibition dose-dépendante de l'infection est également observée avec une diminution de l'infection de 60 % pour la dose la plus élevée. Par ailleurs, aucune toxicité n'a été mesurée en PHH même pour la concentration de PALA à 100 µM (Figure 58B). En l'absence de

thérapie spécifique pour lutter contre le HDV, le pouvoir antiviral du PALA ainsi que sa faible toxicité en font une molécule candidat très intéressante pour une stratégie de développement préclinique.

3. Validation fonctionnelle du PALA dans l'inhibition de l'infection par le HDV

CAD est une enzyme trifonctionnelle catalysant les premières étapes de la voie de biosynthèse des pyrimidines aboutissant *in fine* à la synthèse d'UMP (uridine monophosphate) (Figure 59A). Nous avons voulu étudier si le rôle de CAD dans l'infection du HDV est lié à ses fonctions enzymatiques connues ou si son rôle dépend de fonctions non décrites. Pour cela, nous avons réalisé une expérience de complémentation de l'inhibition de CAD par l'ajout d'uridine dans le milieu de culture. Les résultats obtenus montrent que la complémentation par l'uridine permet de restaurer l'infection virale en présence de PALA (Figure 59B-C). Plus précisément, les réactions enzymatiques de CAD catalysent la formation de dihydroorotate (DHO) à partir de glutamine (Glu). Nous avons réalisé une expérience de complémentation de l'inhibition de CAD par Glu et DHO. Nous avons ainsi observé que la complémentation par DHO permet de restaurer l'infection HDV en présence de PALA. En revanche, la

Résultats – Partie II

complémentation par Glu ne restaure pas l'infection virale en présence de PALA (Figure 59D-E). En conclusion, les fonctions enzymatiques de CAD dans la voie de biosynthèse des pyrimidines constituent un facteur nécessaire à la réplication du HDV.

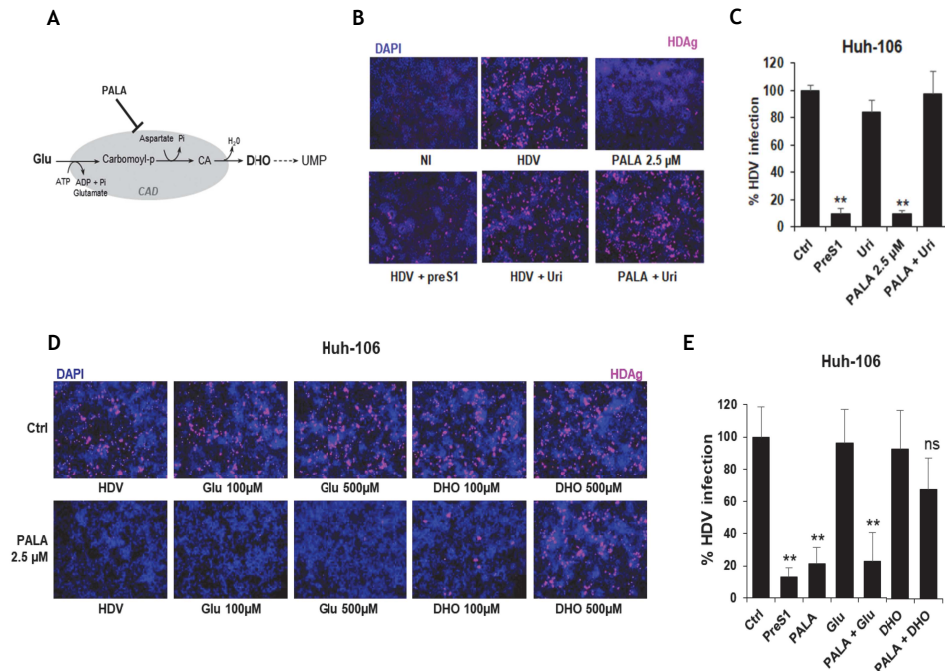


Figure 59. Caractérisation fonctionnelle du rôle de CAD dans l'infection HDV. (A) Représentation schématique des réactions enzymatiques catalysées par CAD. (B-C) Des cellules Huh106 ont été traitées avec PALA (2,5 μM) et/ou de l'uridine (30 μM) pendant 24 heures avant d'être infectées par le HDV. Les cellules ont ensuite été cultivées pendant 7 jours en présence des différents traitements. L'infection HDV a été analysée par immunofluorescence (B) et par RT-qPCR (C). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SEM de l'infection relative par le HDV comparée aux cellules infectées non-traitées (Ctrl, définie à 100 %) à partir de trois expériences indépendantes (n=6). ** $p < 0,01$ (test U de Mann-Whitney bilatéral) (D-E) Des cellules Huh106 ont été traitées avec différentes concentrations de dihydroorotate (DHO) ou de L-glutamine (Glu) pendant 24 heures avant d'être infectées par HDV. Les cellules ont ensuite été cultivées pendant 7 jours en présence de DHO ou de Glu. L'infection HDV a été analysée par immunofluorescence (D). Une expérience représentative est montrée. L'infection a également été mesurée par RT-qPCR sur les conditions de traitement DHO et Glu à 500 μM (E). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SEM de l'infection relative par le HDV comparée aux cellules infectées non-traitées (Ctrl, définie à 100 %) à partir de trois expériences indépendantes (n=6). ** $p < 0,01$; ns $p > 0,05$ (test U de Mann-Whitney bilatéral) (adapté de Verrier *et al.*, 2020).

4. Mise en place d'une lignée Huh106 CAD^{KO}

Afin d'étudier le rôle de CAD dans la physiologie hépatique et son implication dans d'autres infections virales, j'ai produit des lignées Huh106 CAD^{KO} grâce à la technologie CRISPR-Cas9. Pour cela, j'ai produit des lentivirus exprimant 2 sgARN différents ciblant CAD. Des cellules Huh106 surexprimant Cas9 (Huh106-Cas9) ont été transduites avec les lentivirus puis les cellules transduites ont été sélectionnées par ajout d'hygromycine dans le milieu de culture. Le milieu de culture a également été complétement par de l'uridine afin d'éviter une

Résultats – Partie II

potentielle toxicité due à l'absence d'expression de CAD. Une semaine après sélection, la perte d'expression de CAD a été vérifiée par western blot. Les résultats obtenus montrent une perte complète de l'expression de CAD dans les cellules transduites avec le guide 1 et une diminution très forte de l'expression de CAD dans les cellules transduites avec le guide 2 (**Figure 60A**).

Par la suite, j'ai voulu valider la perte d'expression de CAD de manière fonctionnelle par infection par HDV. Afin d'éviter un effet sur l'infection HDV de la présence d'uridine dans le milieu de culture, les cellules ont été cultivées en absence d'uridine pendant une semaine avant d'être infectées. Malheureusement, les résultats d'immunofluorescence et de RT-qPCR obtenus montrent que les cellules CAD^{KO} produites sont sensibles à l'infection par HDV (**Figure 60B-D**). Les pyrimidines étant un constituant cellulaire essentiel, plusieurs voies menant à leur biosynthèse existent. Lorsque la voie de biosynthèse classique est compromise ou en présence de différents stress, la voie dite *salvage* peut assurer la biosynthèse des pyrimidines (Okesli *et al.*, 2017). La susceptibilité à l'infection par le HDV des lignées CAD^{KO} produites pourrait s'expliquer par un maintien de la synthèse d'uridine par la voie *salvage*.

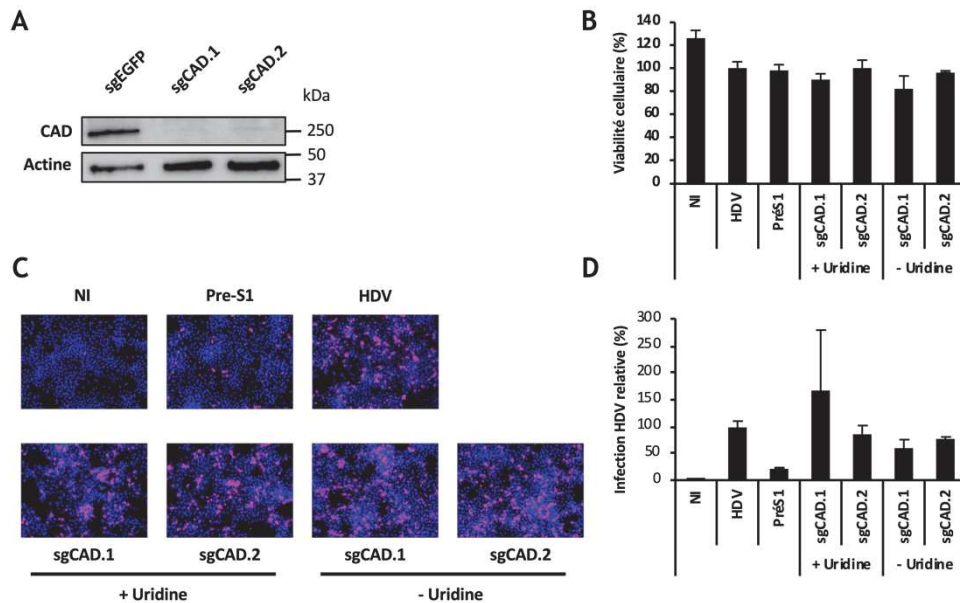


Figure 60. Mise en place d'une lignée Huh106 CAD^{KO}. Des cellules Huh106 surexprimant Cas9 (Huh106-Cas9) ont été transduites avec des lentivirus exprimant 2 sgARN ciblant *CAD* (sgCAD.1 et sgCAD.2) ou un sgARN contrôle ciblant *EGFP* (sgEGFP). Les cellules transduites ont été sélectionnées pendant une semaine par ajout d'hygromycine (250 µg/ml) dans le milieu de culture. La perte d'expression de CAD a été vérifiée par western blot (**A**). Une expérience représentative est montrée. Les cellules ont été cultivées une semaine en présence ou en absence d'uridine (30 µM) avant d'être infectées par HDV. Les cellules ont ensuite été cultivées pendant 7 jours en absence d'uridine. La viabilité cellulaire a été mesurée par PrestoBlue (**B**). L'infection HDV a été analysée par immunofluorescence (**C**) et par RT-qPCR (**D**). **B** et **D** Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- écart type de l'infection relative par le HDV ou de la viabilité cellulaire comparée aux cellules non-traitées (HDV, définie à 100%) à partir d'une expérience représentative (n=3).

Résultats – Partie II

5. Mini-criblage par perte-de-fonction ciblant 10 gènes de la famille des SLC

La découverte et la caractérisation de CAD et ESR1 comme facteurs d'hôte du HDV ont validé l'approche de criblage pour la découverte de facteurs d'hôte potentiels. Parmi les 191 gènes identifiés par le criblage, 10 font partie de la grande famille des SLC composée de protéines transmembranaires impliquées dans le transport de différents éléments (**Tableau 1**). Le HBV et le HDV partageant les mêmes glycoprotéines d'enveloppe, et de ce fait les mêmes mécanismes d'entrée, j'ai réalisé un mini-criblage par perte-de-fonction de ces 10 gènes sur nos modèles cellulaires d'infection HBV et HDV. L'identification d'un facteur impliqué dans les deux infections virales pourrait mener à la caractérisation d'un nouveau facteur d'entrée.

Gène	Protéine	Fonctions	Référence
SLC37A4	G6PT1	Régule le transport du glucose-6-phosphate du cytoplasme vers le RE	Cappello <i>et al.</i> , 2018
SLC22A5	OCTN2	Régule l'import cytoplasmique de carnitine	Longo <i>et al.</i> , 2016
SLC11A2	DCT1	Transporteur impliqué dans l'import intracellulaire de fer	Gunshin <i>et al.</i> , 2005
SLC16A3	MCT4	Régule l'efflux d'acide lactique intracellulaire	Zhao <i>et al.</i> , 2019
SLC30A1	ZNT1	Régule l'efflux et maintient l'homéostasie de zinc	Sankavaram & Freake, 2012
SLC22A9	OAT7	Impliqué dans le transport de médicament (rôle peu connu)	Vildhehe <i>et al.</i> , 2018
SLC29A2	ENT2	Impliqué dans le transport d'adénine	Tanaka <i>et al.</i> , 2020
SLC3A2	CD98	Impliqué dans l'import d'acides aminés neutres	Yanagida <i>et al.</i> , 2001
SLC39A4	ZIP4	Régule l'import et maintient l'homéostasie de zinc	Weaver <i>et al.</i> , 2010
SLC2A2	GLUT2	Impliqué dans l'import de glucose dans les hépatocytes	Thorens, 2015

Tableau 1. Liste des noms du gène et de la protéine ainsi que de la fonction des 10 protéines de la famille des SLC ciblées dans le mini-criblage.

Depuis le criblage précédent, nous avons développé notre propre modèle de cellules Huh7 surexprimant NTCP et appelé Huh7-NTCP. Des cellules Huh7-NTCP et HepG2-NTCP ont été transfectées avec les siARN puis infectées 3 jours après par HDV ou HBV, respectivement. L'infection HDV a été révélée par immunofluorescence et RT-qPCR. L'infection HBV a également été détectée par immunofluorescence et la réplication virale a été quantifiée par quantification de AgHBe dans les surnageants de culture par ELISA.

Les résultats obtenus sur le modèle d'infection HDV ont montré une forte diminution de l'infection uniquement suite au silencing de SCL22A5 (**Figure 61A-C**), sans effet sur la viabilité cellulaire. Le *silencing* de SLC22A5 montre également une diminution de l'infection

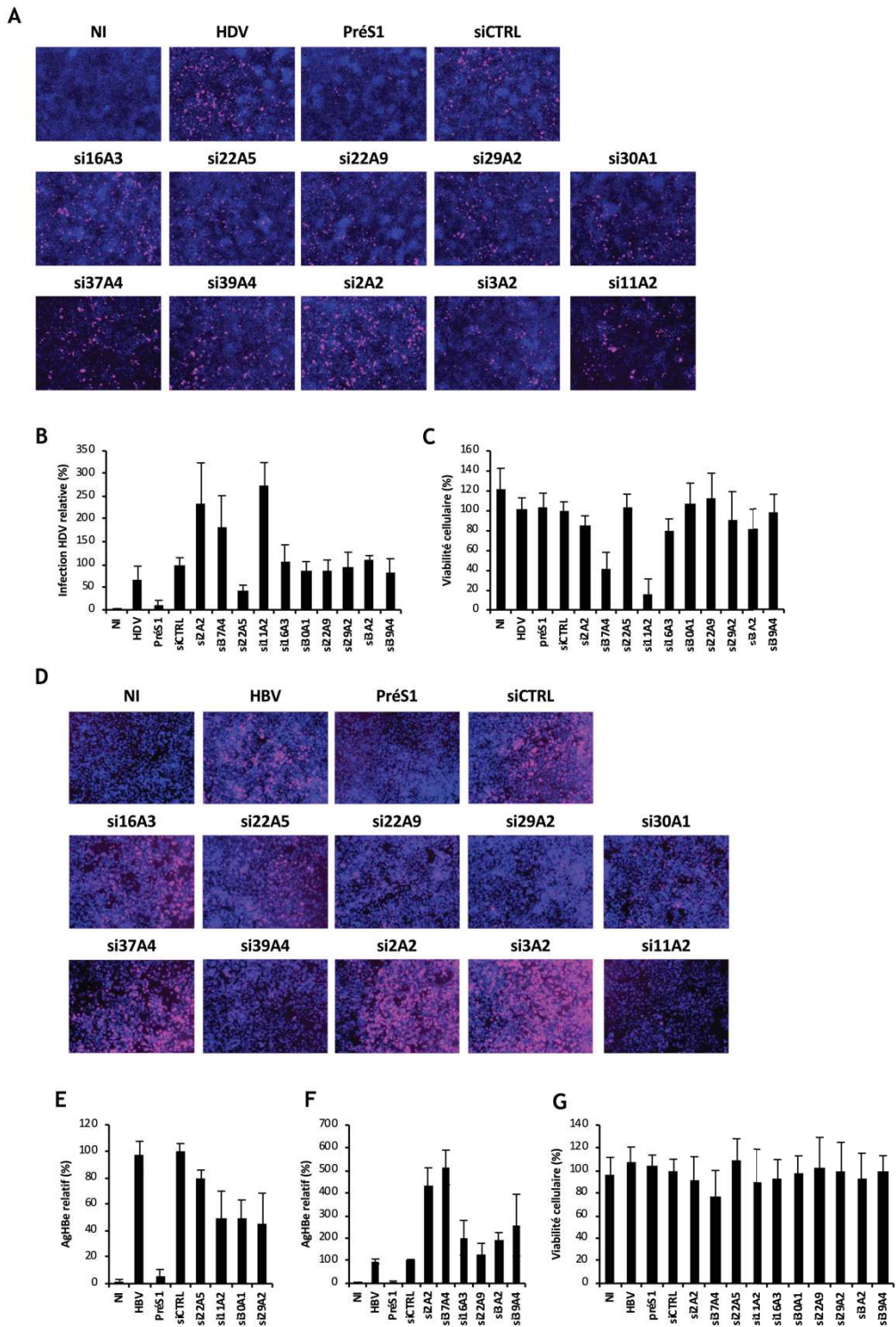


Figure 61. Mini-criblage par perte de fonction ciblant des protéines SLC pour l'identification de facteurs d'hôtes impliqués dans l'entrée du HDV et du HBV. (A-C) Des cellules Huh7-NTCP ont été transfectées pendant 72 heures avec des siARN ciblant différents ARNm de protéines SLC ou un siARN contrôle (siCTRL) puis infectées par le HDV pendant 7 jours. L'infection par le HDV a été analysée par immunofluorescence (A). Une expérience représentative est montrée. L'infection par le HDV a également été mesurée par RT-qPCR (B). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SEM de l'infection relative par le HDV comparée aux cellules transfectées avec siCTRL (siCTRL, définie à 100 %) à partir d'une expérience représentative (n=3). La viabilité cellulaire a été mesurée par PrestoBlue (C). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SEM de la viabilité cellulaire comparée aux cellules transfectées avec siCTRL (siCTRL, définie à 100 %) à partir de trois expériences indépendantes (n=9). (D-F) Des cellules HepG2-NTCP ont été transfectées pendant 3 jours avec des siARN ciblant différentes ARNm de protéines SLC ou un siARN contrôle (siCTRL) puis infectées par le HBV pendant 10 jours. L'infection par le HBV a été analysée par immunofluorescence (D). Une expérience représentative est montrée. L'infection par le HBV a également été mesurée par ELISA AgHBe (E-F). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SEM de la quantité relative d'AgHBe détectée par ELISA comparée aux cellules transfectées avec siCTRL (siCTRL, définie à 100 %) à partir de deux expériences indépendantes (n=4). Par souci de représentation, les conditions induisant une baisse de l'infection HBV (E) ont été représentées sur un graphique différent des conditions induisant une augmentation de l'infection HBV (F). La viabilité cellulaire a été mesurée par PrestoBlue (F). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SEM de la viabilité cellulaire comparée aux cellules transfectées avec siCTRL (siCTRL, définie à 100 %) à partir de deux expériences indépendantes (n=6).

par HBV de 20 % (Figure 61D-E+G). Les résultats obtenus sur le modèle HBV montrent également une baisse de l'infection lors de la diminution de l'expression de SLC11A2, SLC30A1 et SLC29A2. De manière surprenante, la diminution de l'expression de SLC2A2 induit une forte augmentation de l'infection HBV qui n'est pas liée à une toxicité majeure (Figure 61D-F). SLC22A5 étant le seul gène induisant une baisse de l'infection des deux virus sans toxicité observée, ce gène a été sélectionné pour des validations complémentaires.

6. Caractérisation du rôle de SLC22A5 dans l'infection par HBV et HDV

a. Validation de SLC22A5 comme facteur d'hôte du HBV et du HDV

Les siARN utilisés lors du criblage étant composés d'un ensemble de 4 siARN différents, j'ai réalisé une déconvolution de l'ensemble de siARN ciblant SLC22A5 afin d'étudier l'effet individuel des différents siARN. Des cellules Huh7-NTCP et HepG2-NTCP ont été transfectées avec les siARN puis infectées 3 jours après par HDV ou HBV, respectivement. En parallèle, la baisse de l'expression de SLC22A5 a été vérifiée par western blot (Figure 62A).

Après 7 jours, l'infection HDV a été observée par immunofluorescence (Figure 62B) et quantifiée par RT-qPCR (Figure 62C) et la viabilité cellulaire a été mesurée (Figure 62D). La transfection des si22A5.2 et si22A5 pool induit une forte diminution de l'infection par HDV d'environ 60-70 % sans toxicité majeure (80%). La transfection du si22A5.4 induit également une diminution de l'infection d'environ 60 %, cependant elle induit également une diminution marquée de la viabilité cellulaire (50%).

Résultats – Partie II

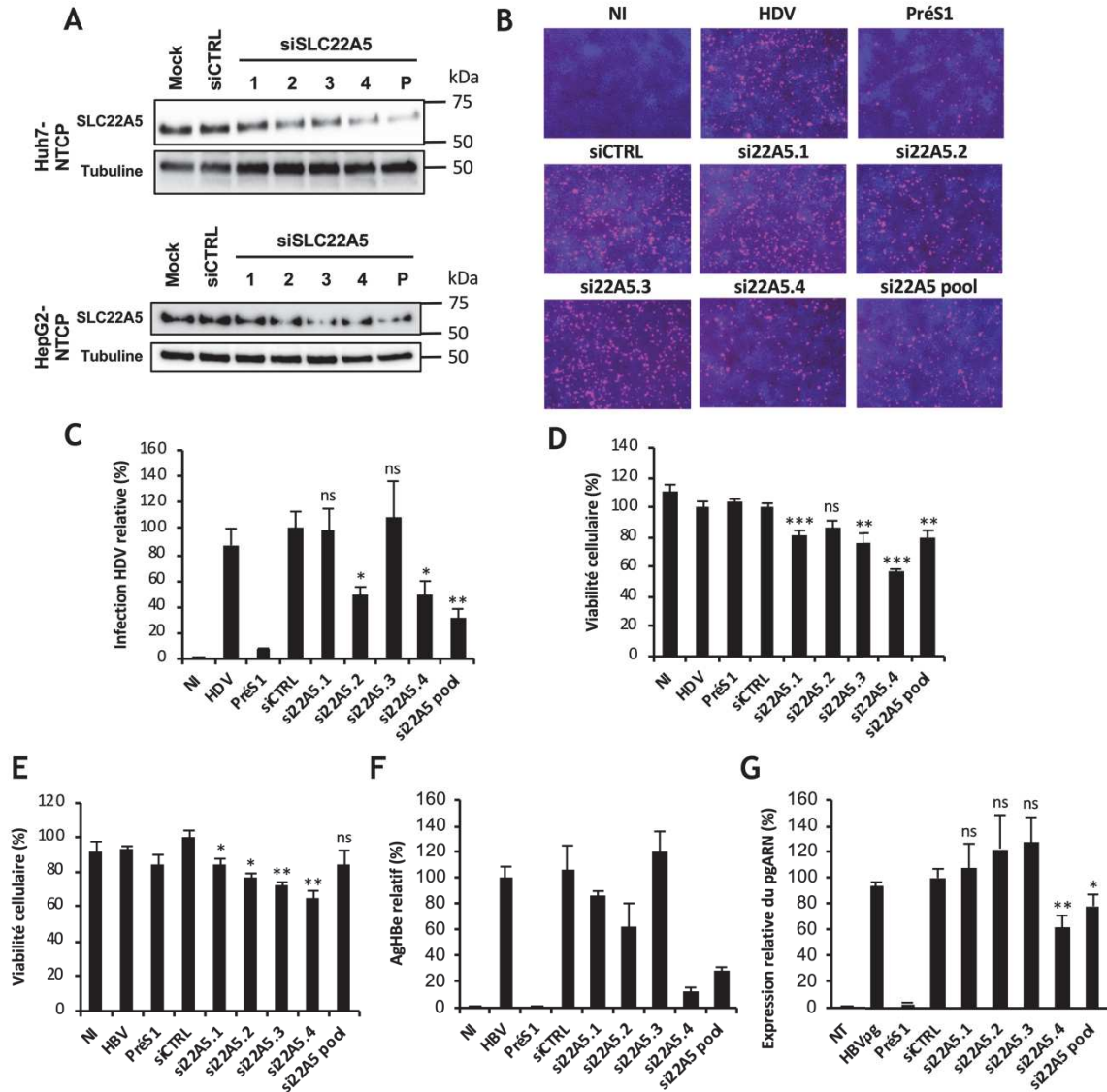


Figure 62. Validation de SLC22A5 comme facteur d'hôte impliqué dans le cycle viral du HBV et du HDV. Des cellules Huh7-NTCP et HepG2-NTCP ont été transfectées avec quatre siARN individuels ciblant *SLC22A5* ou avec l'ensemble de ces quatre siARN (si22A5 pool). L'efficacité de diminution de l'expression de *SLC22A5* a été observée par western blot 72 heures post-transfection (**A**). Une seule expérience représentative est montrée. Les cellules Huh7-NTCP ont été infectées par le HDV pendant 7 jours et l'infection virale a été analysée par immunofluorescence (**B**). Une expérience représentative est montrée. L'infection par le HDV a également été analysée par RT-qPCR (**C**). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SEM de l'infection relative par le HDV comparée à la condition siCTRL à partir de trois expériences indépendantes ($n=6$). La viabilité cellulaire a été mesurée par PrestoBlue (**D**). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SEM de la viabilité cellulaire relative comparée à la condition siCTRL à partir de trois expériences indépendantes ($n=9$). (**E-G**) Les cellules HepG2-NTCP ont été infectées par le HBV pendant 10 jours. La viabilité cellulaire a été mesurée par PrestoBlue (**E**). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SEM de la viabilité cellulaire relative comparée à la condition siCTRL à partir de deux expériences indépendantes ($n=6$). La sécrétion de AgHBe a été analysée par mesure de AgHBe par ELISA dans les surnageants de culture (**F**). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SEM de la quantité relative d'AgHBE comparée à la condition siCTRL à partir de deux expériences indépendantes ($n=4$). La réplication virale a été analysée par détection du pgARN par RT-qPCR (**G**). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SEM de la quantité relative de pgARN comparée à la condition siCTRL à partir de deux expériences indépendantes ($n=6$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns $p > 0,05$ (test U de Mann-Whitney bilatéral).

L'infection HBV a été arrêtée après 10 jours et quantifiée par détection de AgHBe dans le surnageant de culture par ELISA et par quantification de l'ARNpg par RT-qPCR. La viabilité cellulaire a également été mesurée (**Figure 62E**). La transfection de si22A5.2 induit une diminution de la quantité de HBe (60 %) mais n'a pas d'effet sur la quantité d'ARNpg (**Figure 62F-G**). La transfection de si22A5.4 induit une diminution de la sécrétion de AgHBe de 90 % et de la quantité d'ARNpg de 40 %, cependant elle induit une baisse de la viabilité cellulaire de 30 %. La transfection de si22A5 pool induit une diminution de la sécrétion de HBe de 70 % corrélée à une baisse de la quantité d'ARNpg de 20 % sans induire de toxicité (**Figure 62E-G**).

Les résultats obtenus valident le rôle de SLC22A5 comme facteur d'hôte des infections par le HDV et le HBV. Le si22A5 pool ayant montré la meilleure efficacité dans l'inhibition des infections par le HDV et le HBV avec une moindre toxicité cellulaire, il a été sélectionné pour la suite des expériences.

b. Établissement de lignées SLC22A5^{KO}

Afin de confirmer l'importance de SLC22A5, j'ai ensuite invalidé l'expression de SLC22A5 dans des lignées Huh7-NTCP par la technologie CRISPR-Cas9. Pour cela, j'ai cloné, grâce à la technique de Gibson, deux séquences de sgARN ciblant SLC22A5 dans un plasmide codant également Cas9 et permettant la production de particules lentivirales. J'ai produit les particules lentivirales et transduit des cellules Huh7-NTCP. Après 3 jours, les cellules transduites ont été sélectionnées par ajout de puromycine dans le milieu de culture. Les cellules ont ensuite été amplifiées et après 10 jours l'expression de SLC22A5 a été détectée par western blot. Malheureusement, aucun des deux sgARN n'a induit de perte de l'expression de SLC22A5 (**Figure 63A**).

J'ai employé une autre stratégie afin d'induire la perte d'expression de SLC22A5 sur un temps plus court et ne nécessitant pas l'amplification des cellules avant infection par HDV. Pour cela, des cellules Huh7-NTCP ont étéensemencées en plaque 96 puits puis transduites par ajout du surnageant contenant les particules lentivirales. Après 6 heures, le milieu a été remplacé par du milieu de sélection contenant de la puromycine. Après 5 jours, les cellules ont été infectées par HDV et l'expression de SLC22A5 a été détectée en parallèle par western blot. Malheureusement, cette stratégie n'a pas non plus permis d'obtenir une perte d'expression de SLC22A5 (**Figure 63B**).

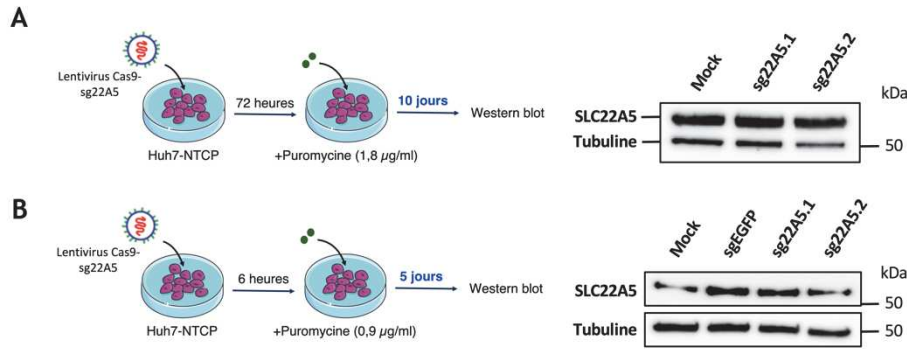


Figure 63. Mise en place de la lignée Huh7-NTCP SLC22A5^{KO}. (A-B) Représentation schématique des stratégies expérimentales utilisées pour induire un KO du gène SLC22A5 et analyse de l'expression de SLC22A5 par western blot. (A-B) Une expérience représentative est montrée.

c. Caractérisation du rôle de SLC22A5 dans l'infection par HDV et HBV

SLC22A5 est exprimé au niveau de la membrane plasmique et permet l'import de carnitine qui est impliquée dans l'oxydation des acides gras au niveau de la mitochondrie (Longo *et al.*, 2016). En 2017, une étude portant sur l'administration de médicaments a mené à la production de nanoparticules conjuguées à de la carnitine (Kou *et al.*, 2017). L'étude a montré que l'ajout de carnitine sur les nanoparticules induisait leur transport au niveau de la barrière intestinale par endocytose dépendante de SLC22A5. De plus, l'ajout de carnitine libre lors de l'administration des nanoparticules induisait une compétition et inhibait l'endocytose des nanoparticules.

Les particules virales du HDV ayant une taille similaire à celle des nanoparticules utilisées dans l'étude et SLC22A5 étant potentiellement impliqué dans l'infection par HBV et HDV, j'ai voulu vérifier si SLC22A5 est impliqué dans l'entrée du HBV et du HDV de manière similaire à l'endocytose observée pour les nanoparticules. J'ai réalisé une expérience de compétition de l'entrée virale avec de la carnitine libre. Les cellules Huh7-NTCP ont été traitées 4 heures avant infection par deux concentrations différentes de carnitine. Les virions utilisés lors de l'infection ont également été incubés en présence de carnitine. Afin de tester l'impact de la carnitine sur l'entrée virale, la carnitine a été retirée après les 16 heures d'infection lors du changement de milieu (condition 4h). Pour éviter de manquer l'observation d'un effet de la carnitine sur l'infection virale, une autre condition a été testée où les cellules restaient incubées en présence de carnitine jusqu'à l'arrêt de l'expérience (conditions 4h + 7j ; **Figure 64A**). Les résultats obtenus montrent qu'aucune des conditions d'ajout de carnitine n'a

Résultats – Partie II

d'effet sur l'infection par HDV (Figure 64B-C). Le rôle de SLC22A5 dans l'infection par HDV est donc indépendant de son rôle de transporteur de carnitine.

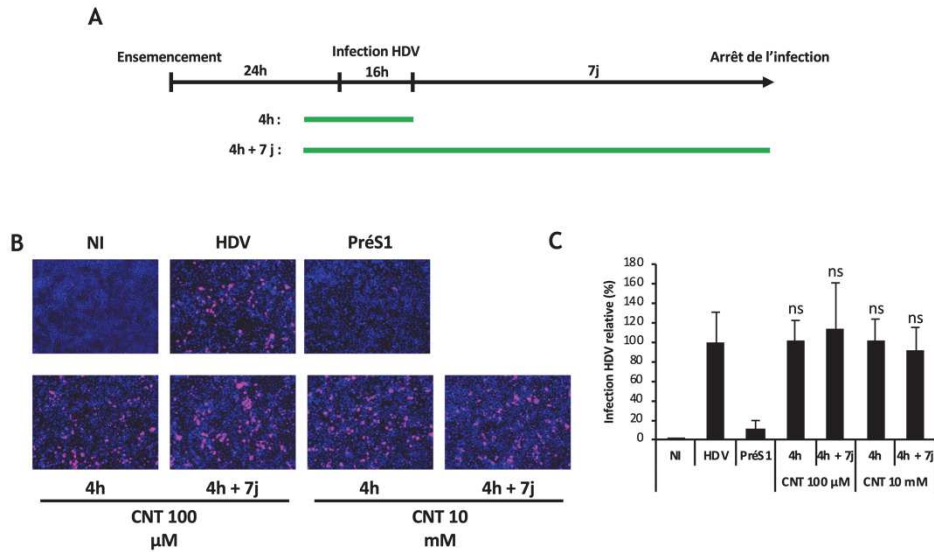


Figure 64. Étude de l'effet d'un traitement à la carnitine sur l'infection HDV. Des cellules Huh7-NTCP ont été traitées par deux concentrations différentes de carnitine (CNT) 4 heures avant d'être infectées par le HDV. Elles ont ensuite été cultivées pendant 7 jours en absence (4h) ou en présence (4h + 7j) de CNT. Les différentes conditions de durée de traitement sont schématisées (A). L'infection HDV a été analysée par immunofluorescence (B). Une expérience représentative est montrée. L'infection par le HDV a également été analysée par RT-qPCR (C). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SEM de la quantité relative de l'ARN du HDV comparée à la condition siCTRL à partir de deux expériences indépendantes ($n=6$). ns $p > 0,05$ (test U de Mann-Whitney bilatéral).

Lors de l'entrée virale, les facteurs d'attachement et d'entrée jouent deux rôles différents. Les facteurs d'attachement sont généralement impliqués dans la première interaction avec le virus permettant de rapprocher le virus de la surface cellulaire. Ces interactions sont souvent peu spécifiques et de faible affinité. Les facteurs d'entrée interagissent avec le virus de manière spécifique et plus forte que les facteurs d'attachement et sont généralement impliqués, de manière directe ou indirecte, dans le franchissement de la membrane plasmique par le virion. Une expérience d'attachement a été réalisée afin de déterminer si SLC22A5 est impliqué dans l'attachement des particules virales à la surface cellulaire. Des cellules Huh7-NTCP ont été transfectées avec des siARN ciblant SLC22A5. Après 3 jours, les cellules ont été incubées en présence de virions HDV et incubées à 16°C pendant 24 heures. L'incubation à basse température permet d'empêcher l'entrée virale sans empêcher l'attachement des particules virales à la surface cellulaire. Un contrôle a été réalisé par incubation du virus en présence d'héparine inhibant complètement l'attachement des particules virales. Après incubation, les cellules sont lavées plusieurs fois afin d'éliminer les

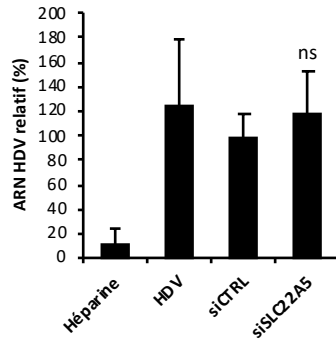


Figure 65. Etude de l'implication de SLC22A5 dans l'attachement des particules du HDV. Des cellules Huh7-NTCP ont été transfectées avec un siARN ciblant *SLC22A5* (siSLC22A5) ou un siARN contrôle (siCTRL). Après 3 jours, les cellules ont été incubées en présence de HDV à 16°C pendant 24 heures. Un contrôle négatif a été réalisé en présence d'héparine. Trois lavages successifs ont été réalisés et les ARN totaux ont été extraits. L'ARN du HDV a été détecté par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SEM de la quantité relative de l'ARN du HDV comparée à la condition siCTRL à partir de deux expériences indépendantes ($n=6$). ns $p > 0,05$ (test U de Mann-Whitney bilatéral).

particules virales non attachées. L'ARN des particules virales retenues à la surface cellulaire est récupéré et le génome viral est détecté par RT-qPCR (Figure 65). La quantité d'ARN viral détectée lorsque l'expression de SLC22A5 est diminuée est comparable à celle détectée dans la condition contrôle. SLC22A5 n'est donc pas impliqué dans l'attachement des particules virales à la surface cellulaire.

7. Validation du rôle de SLC2A2 dans l'infection par HBV

Lors du criblage, j'ai observé que la diminution de l'expression de SLC2A2 induit une augmentation de l'infection par HBV et n'a aucun effet sur l'infection par HDV. SLC2A2 est un transporteur de glucose exprimé au niveau des cellules bêta des îlots de Langerhans, des reins et du foie. Dans le foie, il joue un rôle majeur dans l'import du glucose tandis que dans les autres organes il joue plutôt un rôle de senseur du glucose (Thorens, 2015). Afin de confirmer les résultats obtenus lors du criblage, des cellules HepG2-NTCP ont été transfectées avec un siARN ciblant SLC2A2 puis ont été infectées par HBV trois jours après. Au moment de l'infection, la diminution de l'expression de SLC2A2 a été vérifiée par RT-qPCR et par western blot (Figure 66A). Après 10 jours, l'infection par HBV a été mesurée par détection de AgHBe dans le surnageant et de l'ARNpg dans les lysats cellulaires. Les résultats obtenus montrent que la diminution de l'expression de SLC2A2 induit une augmentation de 10 fois de la sécrétion de l'AgHBe et d'environ 3 fois de la quantité d'ARNpg (Figure 66B-C). Ces résultats montrent que SLC2A2 joue un rôle de facteur de restriction dans l'infection par le HBV et que la diminution de son expression favorise la réplication virale.

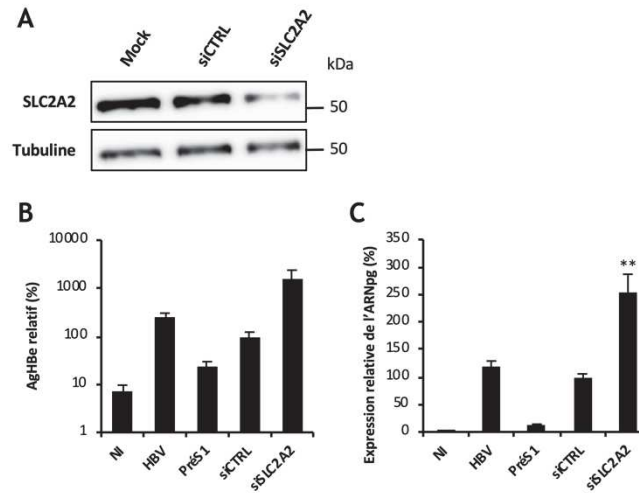


Figure 66. Validation du rôle de SLC2A2 dans l'infection par HBV. Des cellules HepG2-NTCP ont été transfectées avec un siARN ciblant *SLC2A2* (siSLC2A2) ou un siARN contrôle (siCTRL). Après 72 heures, l'efficacité de *silencing* a été vérifiée par western blot (A). Une expérience représentative est montrée. Les cellules ont été infectées par HBV pendant 10 jours. L'infection HBV a été analysée par détection de AgHBe dans le surnageant de culture par ELISA (B). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SEM de la quantité relative d'AgHBe détectée par ELISA comparée aux cellules transfectées avec siCTRL (siCTRL, définie à 100 %) à partir de deux expériences indépendantes ($n=4$). L'infection par le HBV a également été analysée par quantification de l'ARNpg par RT-qPCR (C). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SEM de la quantité relative de l'ARNpg comparée à la condition siCTRL à partir de deux expériences indépendantes ($n=6$). ** $p < 0,01$ (test U de Mann-Whitney bilatéral).

III. Discussion

Le HDV est le plus petit virus en termes de génome capable d'infecter les mammifères et est responsable de l'hépatite D, la forme la plus sévère d'hépatite virale connue. Il ne contient qu'un seul ORF codant pour HDAg (antigène delta) retrouvé sous deux formes, une courte et une longue (Sureau & Negro, 2016). Aucune des deux formes de HDAg ne comporte d'activité enzymatique. De ce fait, le développement de DAA n'est pas applicable pour ce virus. Les traitements spécifiques commercialisés ou en cours d'essai clinique sont des HTA ciblant des protéines impliquées dans différentes étapes du cycle viral. L'étude des interactions entre le HDV et son hôte est alors primordiale pour mieux comprendre le cycle viral et découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques.

Dans ce contexte, nous avons réalisé un criblage par perte-de-fonction ciblant 7598 gènes sur notre modèle d'infection HDV. Le criblage a mis en évidence 191 facteurs d'hôte potentiellement impliqués dans l'infection par HDV. Ces travaux ont permis de valider le rôle de deux candidats, CAD et ESR1, ainsi que le pouvoir antiviral de deux inhibiteurs de ces

Résultats – Partie II

protéines, le PALA, un inhibiteur de CAD, et le Fulvestrant, un inhibiteur d'ESR1, dans l'infection par HDV. Ces découvertes ont donné lieu à une publication dans Gut (Verrier *et al.*, 2020).

Dans ce projet, j'ai participé à la caractérisation de CAD et de son rôle fonctionnel dans l'infection par le HDV ainsi qu'à l'étude du pouvoir antiviral du PALA. Le rôle de CAD dans l'infection par HDV a d'abord été validé par déconvolution des siARN utilisés (Figure 57). Le pouvoir antiviral du PALA a ensuite été mesuré en cellules Huh106 et en PHH (Figure 58). CAD catalyse les 3 premières réactions enzymatiques de la voie de biosynthèse des pyrimidines menant à la synthèse d'uridine. Les réactions enzymatiques de CAD ont pour premier substrat la L-glutamine et comme produit final le dihydroorotate. L'impact du PALA sur la voie de biosynthèse des pyrimidines et l'importance de cette voie dans l'infection par HDV ont été vérifiés par une expérience de complémentation de l'inhibition de CAD par de l'uridine (Figure 59A-C). Le rôle spécifique de CAD a ensuite été précisé par une expérience de complémentation de l'inhibition de CAD par du dihydroorotate permettant de restaurer l'infection HDV, ce qui n'est pas le cas d'une complémentation par de la L-glutamine (Figure 59D-E). Le fort pouvoir antiviral du PALA dans l'infection par HDV ainsi que sa moindre toxicité en PHH en font un bon candidat pour des études précliniques. De ce fait, nous prévoyons d'évaluer le pouvoir antiviral du PALA sur un modèle murin d'infection par le HDV dont nous disposons au laboratoire. La voie de biosynthèse des pyrimidines étant un élément central de la physiologie cellulaire, la toxicité cellulaire ainsi que les effets indésirables devront être largement étudiés. Il est à noter que le Tériflunomide, un inhibiteur de la dihydroorotate déshydrogénase, l'enzyme succédant CAD dans la voie de biosynthèse de pyrimidine, est disponible sur le marché dans le traitement de la sclérose en plaque (Bar-Or *et al.*, 2014). Cependant, le Léflunomide, métabolite actif du Tériflunomide, a fait partie du criblage de petites molécules réalisé par le laboratoire et n'a montré aucun effet sur l'infection par le HDV dans notre modèle (Verrier *et al.*, 2020)

Afin de poursuivre ces travaux, j'ai établi une lignée Huh106 CAD^{KO} (Figure 60A). Afin de favoriser la croissance des cellules, celles-ci ont été cultivées en présence d'uridine dans le milieu de culture. Cependant, l'étude de l'infection par le HDV dans cette lignée cellulaire a montré que malgré l'absence d'expression de CAD, les cellules sont susceptibles à l'infection par le HDV, même après avoir été cultivées une semaine en absence d'uridine (Figure 60C-D). CAD participe à la voie canonique de biosynthèse des pyrimidines. Cependant, lors de stress,

cette voie peut être « *shuntée* ». Afin d'assurer le maintien d'une quantité suffisante d'uridine intracellulaire, une voie dite *salvage* est mise en place. L'uridine et la cytidine sont alors recyclées lors de la dégradation d'acides nucléiques intracellulaires ou peuvent être importés du milieu extracellulaire par des transporteurs situés au niveau de la membrane plasmique (Okesli *et al.*, 2017). Il serait important de vérifier si dans la lignée cellulaire CAD^{KO}, la quantité intracellulaire d'uridine est maintenue même en l'absence de complémentation du milieu par de l'uridine. Il sera également important de réaliser un traitement à long terme par le PALA des souris infectées par le HDV afin d'observer si la voie *salvage* est mise en place et si celle-ci permet une rechute de l'infection par HDV.

Le criblage par perte-de-fonction réalisé a permis de mettre en évidence différentes voies de signalisation potentiellement impliquées dans l'infection par le HDV, dont la voie de signalisation HIF-1 et la voie de résistance à l'insuline (Verrier *et al.*, 2020). L'étude du rôle de ces voies dans l'infection par le HDV permettrait de mieux comprendre la physiologie du virus ainsi que son impact sur les voies de signalisation cellulaire et son rôle dans l'aggravation de la maladie hépatique et la progression vers le CHC. En effet, la voie de signalisation HIF-1 a déjà été décrite comme étant perturbée lors d'une infection par le HCV ce qui pourrait expliquer la progression de la maladie hépatique vers le CHC (Wilson *et al.*, 2014).

Parmi les candidats du criblage ont également été identifiés 11 protéines faisant partie de la grande famille des SLC, dont SLC10A1 ou NTCP, le récepteur du HBV et du HDV. La famille des SLC regroupe un grand nombre de transporteurs transmembranaires impliqués dans l'import ou l'export de molécules variées (*i.e.*, glucose, zinc, fer...) à travers la membrane plasmique ou la membrane mitochondriale. Afin d'identifier un nouveau facteur d'entrée potentiel, un mini-criblage par perte-de-fonction a été réalisé sur nos modèles d'infection par le HDV et le HBV. En effet, le HBV et le HDV partageant les mêmes glycoprotéines virales d'enveloppe, ils partagent également les mêmes mécanismes d'entrée. De plus, la réplication du HDV est entièrement récapitulée dans notre modèle cellulaire en mono-infection, suggérant la dépendance probable du HDV envers le HBV uniquement pour l'étape d'enveloppement et de bourgeonnement. De ce fait, la découverte d'un facteur d'hôte impliqué dans les deux infections virales suggérerait fortement un rôle de celui-ci dans l'entrée virale. Les résultats obtenus lors du criblage ont montré que seule la diminution de l'expression de SLC22A5 induit une inhibition de l'infection par le HDV et le HBV (Figure 61).

J'ai ensuite validé l'importance de SLC22A5 dans les infections par le HBV et le HDV par déconvolution des siARN (**Figure 62**). SLC22A5, également appelée OCTN2 (*Organic cation/carnitine transporter 2*), est un transporteur permettant l'import de carnitine depuis le milieu extracellulaire vers le cytoplasme. La carnitine est ensuite impliquée dans l'oxydation des acides gras au niveau de la mitochondrie (Longo *et al.*, 2016). Afin d'observer si l'ajout de carnitine libre peut inhiber l'infection par le HDV, une expérience de compétition a été réalisée avec 2 concentrations différentes de carnitine (**Figure 64**). Aucun effet de la carnitine sur l'infection par le HDV n'a été observé suggérant que le rôle de SLC22A5 dans l'infection par le HDV est indépendant de son rôle de transporteur de carnitine. Une caractérisation tissulaire de SLC22A5 a été réalisée et a montré que contrairement à d'autres organes, dans le foie SLC22A5 a une faible affinité pour la carnitine mais une haute capacité de transport (Scaglia *et al.*, 1999). L'absence de compétition de la carnitine sur l'entrée du HDV pourrait s'expliquer par ces caractéristiques.

Une expérience d'attachement des particules virales HDV n'a également montré aucun effet de la diminution de l'expression de SLC22A5 sur l'attachement des particules virales HDV à la surface des hépatocytes (**Figure 65**). Il est cependant à noter que l'étape d'attachement fait principalement intervenir des HSPG et que l'absence d'effet du *silencing* de SLC22A5 sur l'attachement des particules virales du HDV ne veut pas dire que SLC22A5 n'est pas un récepteur potentiel du HDV mais uniquement que son rôle potentiel dans l'entrée virale est ultérieur à l'étape d'attachement.

SLC22A5 et la carnitine sont retrouvées impliquées dans diverses pathologies dont des maladies hépatiques. Un mutant récessif de SLC22A5 a été décrit chez les patients induisant une déficience primaire en carnitine (Nezu *et al.*, 1999). Cette déficience entraîne des perturbations de la bêta-oxydation des acides gras, pouvant mener à une défaillance hépatique (Scholte *et al.*, 1990). Afin de vérifier le rôle de SLC22A5 dans l'infection par le HBV et le HDV, il serait intéressant d'étudier la capacité d'interaction entre les différents domaines de AgHBs et SLC22A5. S'il y a une interaction, il est alors possible que l'infection par le HBV et le HDV induise une déficience intracellulaire en carnitine, notamment en entrant en compétition avec celle-ci au niveau de SLC22A5. La carnitine ayant une faible affinité pour son récepteur lorsqu'il est exprimé à la surface des hépatocytes (Scaglia *et al.*, 1999), la grande quantité de SVP produite lors de l'infection pourrait diminuer l'import de carnitine et induire

Résultats – Partie II

une déficience pouvant être impliquée dans la progression de la maladie hépatique. Il serait intéressant d'étudier l'impact de la présence de AgHBs, sous forme libre ou sous forme de SVP purifiées, dans le milieu extracellulaire sur l'import intracellulaire de carnitine en réalisant une expérience de dose-réponse par exemple avec une concentration fixe de carnitine et des concentrations croissantes de AgHBs libre ou de SVP.

De manière intéressante, les résultats du mini-criblage ont montré que le *silencing* de SLC2A2 induit une forte augmentation de l'infection par HBV sans avoir d'effet sur l'infection HDV (Figure 61). L'effet de l'expression de SLC2A2 sur l'infection HBV a ensuite été validé (Figure 66). SLC2A2, ou GLUT2 (*Glucose transporter 2*), est un transporteur de glucose exprimé à la membrane plasmique des hépatocytes, des cellules bêta des îlots de Langerhans, de l'intestin et de l'épithélium rénal. Dans le foie, GLUT2 semble principalement jouer un rôle d'import de glucose dans les hépatocytes tandis qu'il joue un rôle de senseur de glucose au niveau des cellules bêta. Différentes études d'inactivation réalisées chez la souris ont montré que l'absence de SLC2A2 empêche l'absorption hépatique du glucose mais celui-ci est redirigé vers d'autres tissus afin de maintenir un contrôle de la glycémie. Cependant, les souris ont progressivement développé une intolérance au glucose, les perturbations du métabolisme du glucose hépatique induisant un dysfonctionnement progressif des cellules bêta (Thorens,

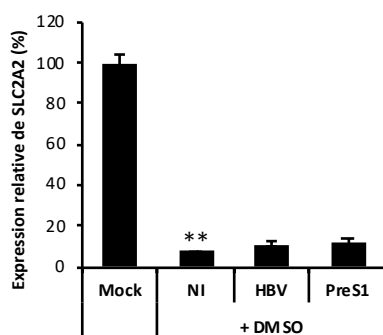


Figure 67. Étude de l'impact de l'infection par HBV sur l'expression de SLC2A2. Des cellules HepG2-NTCP ont été infectées par HBV pendant 10 jours puis l'expression de SLC2A2 a été analysée par RT-qPCR. Après infection, les cellules sont cultivées dans un milieu contenant 3,5 % DMSO. La condition Mock correspond aux cellules cultivées pendant 3 jours dans le milieu de culture HepG2-NTCP ne contenant pas de DMSO. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SEM de la quantité relative de l'ARNm de SLC2A2 comparée à la condition Mock à partir de trois expériences indépendantes ($n=6$). ** $p < 0,01$ (test U de Mann-Whitney bilatéral).

2015). Deux études de transcriptomique récentes, l'une réalisée sur des cellules Huh7 et l'autre sur des hépatocytes primaires de rat, ont montré que l'expression du génome du HBV induit une forte diminution de l'expression de SLC2A2 dans les hépatocytes (Jagya *et al.*, 2014; Lamontagne *et al.*, 2016). Dans notre modèle cependant, aucune diminution de l'expression de SLC2A2 induite par l'infection par le HBV n'a été détectée (Figure 67). En revanche, le traitement au DMSO permettant de

garder les cellules en culture durant les 10 jours d'infection induit une diminution de l'expression de SLC2A2 de plus de 90 % par rapport à des cellules cultivées en absence de DMSO (Figure 67). Différentes analyses sur des cohortes de patients ont montré que les patients infectés chroniquement par le HBV sont plus à risque de développer un diabète (Cai *et al.*, 2015; Hong *et al.*, 2017b). Il serait intéressant d'étudier l'impact de l'infection par le HBV chez les patients sur l'expression de SLC2A2, sur la tolérance au glucose et sur la physiologie des cellules bêta.

D'après les résultats obtenus, SCL2A2 joue un rôle de facteur de restriction du HBV. Afin de confirmer ces résultats, il serait intéressant de produire des lignées cellulaires surexprimant SLC2A2 ou KO pour l'expression de SLC2A2 afin de valider l'impact de la modulation de l'expression de ce gène sur l'infection HBV. Notre modèle de culture avec du DMSO diminue fortement l'expression de SLC2A2 (Figure 67), le modèle de surexpression serait particulièrement intéressant dans ce cas. Il serait également intéressant de réaliser une cinétique de diminution de l'expression de SLC2A2 par le DMSO. Celle-ci pourrait nous orienter sur l'étape du cycle viral ciblée par SCL2A2. En effet, dans nos expériences de *silencing*, l'expression de SLC2A2 est déjà diminuée lors de l'incubation des cellules en présence du virus. Si le DMSO induit une diminution rapide de l'expression de SLC2A2, les effets observés impacteraient alors les étapes précoces de l'infection par HBV et SLC2A2 jouerait un rôle de facteur de restriction dans les premières étapes de l'infection. SLC2A2 étant un transporteur de glucose, il serait également intéressant d'étudier l'effet de la modulation de la concentration intracellulaire de glucose ou d'inhiber différentes étapes du métabolisme du glucose afin d'observer l'impact du glucose sur l'infection par HBV.

Conclusion

Conclusion

En conclusion, mes travaux de thèse ont permis d'apporter de nouvelles connaissances et de nouvelles hypothèses de recherche dans le domaine des interactions entre l'hépatocyte et les virus hépatiques chroniques HCV, HBV et HDV.

Dans mon premier projet, j'ai pu mettre en évidence l'importance de RACK1 dans la régulation de l'inflammation hépatique. La diminution de l'expression de RACK1 induit une forte activation et une forte expression de différents gènes des voies de l'immunité innée et de l'inflammation. Les mêmes phénotypes sont observés dans des modèles de culture cellulaire d'infection par le HCV ainsi que chez des patients infectés par le HCV. De plus, l'infection par le HCV induit une diminution de l'expression de RACK1 et pourrait induire une séquestration de celle-ci afin de subvenir à la traduction virale, ce qui pourrait contribuer à l'inflammation chronique observée chez les patients. De ce fait, étudier le mécanisme fin de RACK1 dans la régulation de l'inflammation hépatique lors d'une infection par le HCV permettra de mieux comprendre les mécanismes menant à l'inflammation chronique et conduisant à terme au CHC.

Mon second projet a eu pour but la découverte de nouveaux facteurs d'hôte impliqués dans les infections par le HDV et le HBV. J'ai d'abord participé à la validation de CAD en tant que facteur d'hôte du HDV et de son inhibiteur, le PALA, comme molécule antivirale afin de découvrir de nouvelles stratégies thérapeutiques dans l'infection par HDV. Par la suite, j'ai mis en évidence le rôle de SLC22A5 comme facteur d'hôte dans les infections par le HDV et le HBV. J'ai également découvert le rôle de SLC2A2 comme facteur de restriction du HBV. Les mécanismes précis de ces deux facteurs restent cependant à élucider mais permettraient de mieux comprendre les infections par le HBV et le HDV et d'offrir à terme de nouveaux traitements afin de lutter contre ces infections virales.

Dans l'ensemble, l'étude des interactions virus-hôte ont toujours été au centre de la virologie et ont permis de mieux comprendre les mécanismes des infections virales mais également de découvrir de nouveaux mécanismes cellulaires. En plus de l'apport important de connaissances en biologie fondamentale, ces études permettent aussi la découverte de nouveaux traitements innovants nécessaires afin de lutter contre des pathogènes jusqu'alors

Conclusion

incurables ou afin de posséder des options multiples permettant de réagir notamment en cas d'apparition de résistance à un ou plusieurs traitements.

Bibliographie

Bibliographie

- Adams, D.R., Ron, D., and Kiely, P.A. (2011). RACK1, A multifaceted scaffolding protein: Structure and function. *Cell Commun Signal* 9, 22.
- Aguirre, S., Maestre, A.M., Pagni, S., Patel, J.R., Savage, T., Gutman, D., Maringer, K., Bernal-Rubio, D., Shabman, R.S., Simon, V., et al. (2012). DENV Inhibits Type I IFN Production in Infected Cells by Cleaving Human STING. *PLoS Pathog* 8.
- Ahn, J.Y., Jung, E.Y., Kwun, H.J., Lee, C.-W., Sung, Y.-C., and Jang, K.L. (2002). Dual effects of hepatitis B virus X protein on the regulation of cell-cycle control depending on the status of cellular p53. *J. Gen. Virol.* 83, 2765–2772.
- Akil, A., Endsley, M., Shanmugam, S., Saldarriaga, O., Somasunderam, A., Spratt, H., Stevenson, H.L., Utay, N.S., Ferguson, M., and Yi, M. (2019). Fibrogenic Gene Expression in Hepatic Stellate Cells Induced by HCV and HIV Replication in a Three Cell Co-Culture Model System. *Scientific Reports* 9, 1–12.
- Albecka, A., Belouzard, S., Op de Beeck, A., Descamps, V., Goueslain, L., Bertrand-Michel, J., Tercé, F., Duverlie, G., Rouillé, Y., and Dubuisson, J. (2012). Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. *Hepatology* 55, 998–1007.
- Ali, N., and Siddiqui, A. (1997). The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 2249–2254.
- Ali, N., Pruijn, G.J., Kenan, D.J., Keene, J.D., and Siddiqui, A. (2000). Human La antigen is required for the hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. *J. Biol. Chem.* 275, 27531–27540.
- Ali, S., Nouhi, Z., Chughtai, N., and Ali, S. (2003). SHP-2 Regulates SOCS-1-mediated Janus Kinase-2 Ubiquitination/Degradation Downstream of the Prolactin Receptor. *J. Biol. Chem.* 278, 52021–52031.
- Alter, H.J. (2014). The road not taken or how I learned to love the liver: A personal perspective on hepatitis history. *Hepatology* 59, 4–12.
- Alter, H.J., Purcell, R.H., Holland, P.V., and Popper, H. (1978). Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1, 459–463.
- Amako, Y., Sarkeshik, A., Hotta, H., Yates, J., and Siddiqui, A. (2009). Role of Oxysterol Binding Protein in Hepatitis C Virus infection. *Journal of Virology* 83, 9237–9246.
- Ameismeier, M., Cheng, J., Berninghausen, O., and Beckmann, R. (2018). Visualizing late states of human 40S ribosomal subunit maturation. *Nature* 558, 249–253.
- Amini-Bavil-Olyaei, S., Choi, Y.J., Lee, J.H., Shi, M., Huang, I.-C., Farzan, M., and Jung, J.U. (2013). The Antiviral Effector IFITM3 Disrupts Intracellular Cholesterol Homeostasis

- to Block Viral Entry. *Cell Host & Microbe* *13*, 452–464.
- André, P., Komurian-Pradel, F., Deforges, S., Perret, M., Berland, J.L., Sodoyer, M., Pol, S., Bréchet, C., Paranhos-Baccalà, G., and Lotteau, V. (2002). Characterization of Low- and Very-Low-Density Hepatitis C Virus RNA-Containing Particles. *Journal of Virology* *76*, 6919–6928.
 - Anger, A.M., Armache, J.-P., Berninghausen, O., Habeck, M., Subklewe, M., Wilson, D.N., and Beckmann, R. (2013). Structures of the human and Drosophila 80S ribosome. *Nature* *497*, 80–85.
 - Antonucci, T.K., and Rutter, W.J. (1989). Hepatitis B virus (HBV) promoters are regulated by the HBV enhancer in a tissue-specific manner. *J Virol* *63*, 579–583.
 - Appel, N., Zayas, M., Miller, S., Krijnse-Locker, J., Schaller, T., Friebe, P., Kallis, S., Engel, U., and Bartenschlager, R. (2008). Essential Role of Domain III of Nonstructural Protein 5A for Hepatitis C Virus Infectious Particle Assembly. *PLOS Pathogens* *4*, e1000035.
 - Archambault, J., and Melendy, T. (2013). Targeting human papillomavirus genome replication for antiviral drug discovery. *Antivir Ther* *18*, 271–283.
 - Arnaud, N., Dabo, S., Maillard, P., Budkowska, A., Kalliampakou, K.I., Mavromara, P., Garcin, D., Hugon, J., Gatignol, A., Akazawa, D., et al. (2010). Hepatitis C virus controls interferon production through PKR activation. *PLoS ONE* *5*, e10575.
 - Asselah, T., Lada, O., Moucari, R., Martinot, M., Boyer, N., and Marcellin, P. (2007). Interferon therapy for chronic hepatitis B. *Clin Liver Dis* *11*, 839–849, viii.
 - Asselah, T., Boyer, N., Saadoun, D., Martinot-Peignoux, M., and Marcellin, P. (2016). Direct-acting antivirals for the treatment of hepatitis C virus infection: optimizing current IFN-free treatment and future perspectives. *Liver Int.* *36 Suppl 1*, 47–57.
 - Atzori, L., Poli, G., and Perra, A. (2009). Hepatic stellate cell: a star cell in the liver. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *41*, 1639–1642.
 - Awady, M.K.E., and Dawood, R.M. (2017). Resistance to Direct-Acting Antiviral Agents in Treatment of Hepatitis C Virus Infections. *Update on Hepatitis C*.
 - Awe, K., Lambert, C., and Prange, R. (2008). Mammalian BiP controls posttranslational ER translocation of the hepatitis B virus large envelope protein. *FEBS Lett.* *582*, 3179–3184.
 - Babon, J.J., Lucet, I.S., Murphy, J.M., Nicola, N.A., and Varghese, L.N. (2014). The molecular regulation of Janus kinase (JAK) activation. *Biochem J* *462*, 1–13.
 - Bai, Y., Zhou, K., and Doudna, J.A. (2013). Hepatitis C virus 3'UTR regulates viral

Bibliographie

- translation through direct interactions with the host translation machinery. *Nucleic Acids Res* *41*, 7861–7874.
- Bandiera, S., Pfeffer, S., Baumert, T.F., and Zeisel, M.B. (2015). miR-122 – A key factor and therapeutic target in liver disease. *Journal of Hepatology* *62*, 448–457.
 - Bandiera, S., Pernot, S., El Saghire, H., Durand, S.C., Thumann, C., Crouchet, E., Ye, T., Fofana, I., Oudot, M.A., Barths, J., et al. (2016). Hepatitis C Virus-Induced Upregulation of MicroRNA miR-146a-5p in Hepatocytes Promotes Viral Infection and Dereglates Metabolic Pathways Associated with Liver Disease Pathogenesis. *J. Virol.* *90*, 6387–6400.
 - Barba, G., Harper, F., Harada, T., Kohara, M., Goulinet, S., Matsuura, Y., Eder, G., Schaff, Zs., Chapman, M.J., Miyamura, T., et al. (1997). Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 1200–1205.
 - Barin, F., André, M., Goudeau, A., Coursaget, P., and Maupas, P. (1978). Large scale purification of hepatitis B surface antigen (HBsAg). *Ann. Microbiol. (Paris)* *129B*, 87–100.
 - Bar-Or, A., Pachner, A., Menguy-Vacheron, F., Kaplan, J., and Wiendl, H. (2014). Teriflunomide and its mechanism of action in multiple sclerosis. *Drugs* *74*, 659–674.
 - Barrows, N.J., Anglero-Rodriguez, Y., Kim, B., Jamison, S.F., Le Sommer, C., McGee, C.E., Pearson, J.L., Dimopoulos, G., Ascano, M., Bradrick, S.S., et al. (2019). Dual roles for the ER membrane protein complex in flavivirus infection: viral entry and protein biogenesis. *Scientific Reports* *9*, 9711.
 - Bartee, E., Mohamed, M.R., Lopez, M.C., Baker, H.V., and McFadden, G. (2009). The Addition of Tumor Necrosis Factor plus Beta Interferon Induces a Novel Synergistic Antiviral State against Poxviruses in Primary Human Fibroblasts. *Journal of Virology* *83*, 498–511.
 - Bartenschlager, R., and Schaller, H. (1988). The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription. *EMBO J.* *7*, 4185–4192.
 - Bartenschlager, R., Penin, F., Lohmann, V., and André, P. (2011). Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol.* *19*, 95–103.
 - Baumert, T.F., Verrier, E.R., Nassal, M., Chung, R.T., and Zeisel, M.B. (2015). Host-targeting agents for treatment of hepatitis B virus infection. *Curr Opin Virol* *14*, 41–46.
 - Baumert, T.F., Berg, T., Lim, J.K., and Nelson, D.R. (2019). Status of Direct-Acting Antiviral Therapy for Hepatitis C Virus Infection and Remaining Challenges. *Gastroenterology* *156*, 431–445.

Bibliographie

- Bayer, K., Banning, C., Bruss, V., Wiltzer-Bach, L., and Schindler, M. (2016). Hepatitis C Virus Is Released via a Noncanonical Secretory Route. *J Virol* *90*, 10558–10573.
- Bazinet, M., Pantea, V., Cebotarescu, V., Cojuhari, L., Jimbei, P., Krawczyk, A., Dittmer, U., and Vaillant, A. (2019). Ongoing analysis of functional control/cure of HBV and HDV infection following REP 2139-CA and pegylated interferon alpha-2a therapy in patients with chronic HBV/HDV co-infection: 3-year follow-up results from the REP 301-LTF study. *Hepatology* *70*, 440A-440A.
- Beck, J., and Nassal, M. (2007). Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* *13*, 48–64.
- Bedard, K.M., Walter, B.L., and Semler, B.L. (2004). Multimerization of poly(rC) binding protein 2 is required for translation initiation mediated by a viral IRES. *RNA* *10*, 1266–1276.
- Begitt, A., Droescher, M., Knobloch, K.-P., and Vinkemeier, U. (2011). SUMO conjugation of STAT1 protects cells from hyperresponsiveness to IFN γ . *Blood* *118*, 1002–1007.
- Behrens, S.E., Tomei, L., and De Francesco, R. (1996). Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J.* *15*, 12–22.
- Bell, O., Tiwari, V.K., Thomä, N.H., and Schübeler, D. (2011). Determinants and dynamics of genome accessibility. *Nature Reviews Genetics* *12*, 554–564.
- Bellecave, P., Sarasin-Filipowicz, M., Donzé, O., Kennel, A., Gouttenoire, J., Meylan, E., Terracciano, L., Tschopp, J., Sarrazin, C., Berg, T., et al. (2010). Cleavage of mitochondrial antiviral signaling protein in the liver of patients with chronic hepatitis C correlates with a reduced activation of the endogenous interferon system. *Hepatology* *51*, 1127–1136.
- Belov, G.A., Nair, V., Hansen, B.T., Hoyt, F.H., Fischer, E.R., and Ehrenfeld, E. (2012). Complex Dynamic Development of Poliovirus Membranous Replication Complexes. *Journal of Virology* *86*, 302–312.
- Bender, S., Reuter, A., Eberle, F., Einhorn, E., Binder, M., and Bartenschlager, R. (2015). Activation of Type I and III Interferon Response by Mitochondrial and Peroxisomal MAVS and Inhibition by Hepatitis C Virus. *PLoS Pathog* *11*.
- Ben-Shem, A., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2010). Crystal Structure of the Eukaryotic Ribosome. *Science* *330*, 1203–1209.
- Berg, T., Marcellin, P., Zoulim, F., Moller, B., Trinh, H., Chan, S., Suarez, E., Lavocat, F., Snow-Lampart, A., Frederick, D., et al. (2010). Tenofovir is effective alone or with emtricitabine in adefovir-treated patients with chronic-hepatitis B virus infection.

Bibliographie

- Gastroenterology *139*, 1207–1217.
- Berry, K.E., Waghray, S., and Doudna, J.A. (2010). The HCV IRES pseudoknot positions the initiation codon on the 40S ribosomal subunit. *RNA* *16*, 1559–1569.
 - Berry, K.E., Waghray, S., Mortimer, S.A., Bai, Y., and Doudna, J.A. (2011). Crystal Structure of the HCV IRES Central Domain Reveals Strategy for Start-Codon Positioning. *Structure* *19*, 1456–1466.
 - Berting, A., Hahnen, J., Kröger, M., and Gerlich, W.H. (1995). Computer-aided studies on the spatial structure of the small hepatitis B surface protein. *Intervirology* *38*, 8–15.
 - Bhatt, S., Gething, P.W., Brady, O.J., Messina, J.P., Farlow, A.W., Moyes, C.L., Drake, J.M., Brownstein, J.S., Hoen, A.G., Sankoh, O., et al. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature* *496*, 504–507.
 - Bhattacharya, S., Eckner, R., Grossman, S., Oldread, E., Arany, Z., D’Andrea, A., and Livingston, D.M. (1996). Cooperation of Stat2 and p300/CBP in signalling induced by interferon- α . *Nature* *383*, 344–347.
 - Bianco, A., Reghellin, V., Donnici, L., Fenu, S., Alvarez, R., Baruffa, C., Peri, F., Pagani, M., Abrignani, S., Neddermann, P., et al. (2012). Metabolism of phosphatidylinositol 4-kinase III α -dependent PI4P Is subverted by HCV and is targeted by a 4-anilino quinazoline with antiviral activity. *PLoS Pathog.* *8*, e1002576.
 - Binder, M., Quinkert, D., Bochkarova, O., Klein, R., Kezmic, N., Bartenschlager, R., and Lohmann, V. (2007). Identification of Determinants Involved in Initiation of Hepatitis C Virus RNA Synthesis by Using Intergenotypic Replicase Chimeras. *Journal of Virology* *81*, 5270–5283.
 - Biswas, A., Treadaway, J., and Tellinghuisen, T.L. (2016). Interaction between Nonstructural Proteins NS4B and NS5A Is Essential for Proper NS5A Localization and Hepatitis C Virus RNA Replication. *J. Virol.* *90*, 7205–7218.
 - Blach, S., Zeuzem, S., Manns, M., Altraif, I., Duberg, A.-S., Muljono, D.H., Waked, I., Alavian, S.M., Lee, M.-H., Negro, F., et al. (2017). Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* *2*, 161–176.
 - Blight, K.J., McKeating, J.A., and Rice, C.M. (2002). Highly Permissive Cell Lines for Subgenomic and Genomic Hepatitis C Virus RNA Replication. *J Virol* *76*, 13001–13014.
 - Blouin, C.M., and Lamaze, C. (2013). Interferon gamma receptor: the beginning of the journey. *Front Immunol* *4*, 267.
 - Blumberg, B.S., Gerstley, B.J.S., Hungerford, D.A., London, W.T., and Sutnick, A.I.

- (1967). A Serum Antigen (Australia Antigen) in Down's Syndrome, Leukemia, and Hepatitis. *Annals of Internal Medicine* 66, 924–931.
- Bock, C.T., Schwinn, S., Locarnini, S., Fyfe, J., Manns, M.P., Trautwein, C., and Zentgraf, H. (2001). Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome. *J. Mol. Biol.* 307, 183–196.
 - Boldanova, T., Suslov, A., Heim, M.H., and Necseulea, A. (2017). Transcriptional response to hepatitis C virus infection and interferon-alpha treatment in the human liver. *EMBO Mol Med* 9, 816–834.
 - Boldescu, V., Behnam, M.A.M., Vasilakis, N., and Klein, C.D. (2017). Broad-spectrum agents for flaviviral infections: Dengue, Zika and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 16, 565–586.
 - Boulant, S., Targett-Adams, P., and McLauchlan, J. (2007). Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus. *J. Gen. Virol.* 88, 2204–2213.
 - Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J., and Jove, R. (2000). STATs in oncogenesis. *Oncogene* 19, 2474–2488.
 - Brass, A.L., Dykxhoorn, D.M., Benita, Y., Yan, N., Engelman, A., Xavier, R.J., Lieberman, J., and Elledge, S.J. (2008). Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* 319, 921–926.
 - Brass, A.L., Huang, I.-C., Benita, Y., John, S.P., Krishnan, M.N., Feeley, E.M., Ryan, B.J., Weyer, J.L., van der Weyden, L., Fikrig, E., et al. (2009). The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell* 139, 1243–1254.
 - Brazzoli, M., Helenius, A., Fong, S.K.H., Houghton, M., Abrignani, S., and Merola, M. (2005). Folding and dimerization of hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins in stably transfected CHO cells. *Virology* 332, 438–453.
 - Brazzoli, M., Bianchi, A., Filippini, S., Weiner, A., Zhu, Q., Pizza, M., and Crotta, S. (2008). CD81 is a central regulator of cellular events required for hepatitis C virus infection of human hepatocytes. *J. Virol.* 82, 8316–8329.
 - Bréchet, C., Gozuacik, D., Murakami, Y., and Paterlini-Bréchet, P. (2000). Molecular bases for the development of hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC). *Semin. Cancer Biol.* 10, 211–231.
 - Breiman, A., Grandvaux, N., Lin, R., Ottone, C., Akira, S., Yoneyama, M., Fujita, T., Hiscott, J., and Meurs, E.F. (2005). Inhibition of RIG-I-Dependent Signaling to the

- Interferon Pathway during Hepatitis C Virus Expression and Restoration of Signaling by IKK ϵ . *Journal of Virology* 79, 3969–3978.
- Bremer, C.M., Sominskaya, I., Skrastina, D., Pumpens, P., El Wahed, A.A., Beutling, U., Frank, R., Fritz, H.-J., Hunsmann, G., Gerlich, W.H., et al. (2011). N-terminal myristoylation-dependent masking of neutralizing epitopes in the preS1 attachment site of hepatitis B virus. *J. Hepatol.* 55, 29–37.
 - Brianti, P., De Flammis, E., and Mercuri, S.R. (2017). Review of HPV-related diseases and cancers. *New Microbiol.* 40, 80–85.
 - Bright, R.A., Medina, M., Xu, X., Perez-Oroz, G., Wallis, T.R., Davis, X.M., Povinelli, L., Cox, N.J., and Klimov, A.I. (2005). Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet* 366, 1175–1181.
 - Brown, M.G., Dokun, A.O., Heusel, J.W., Smith, H.R.C., Beckman, D.L., Blattenberger, E.A., Dubbelde, C.E., Stone, L.R., Scalzo, A.A., and Yokoyama, W.M. (2001). Vital Involvement of a Natural Killer Cell Activation Receptor in Resistance to Viral Infection. *Science* 292, 934–937.
 - Bruscella, P., Bottini, S., Baudesson, C., Pawlotsky, J.-M., Feray, C., and Trabucchi, M. (2017). Viruses and miRNAs: More Friends than Foes. *Front Microbiol* 8.
 - Bruss, V. (2007). Hepatitis B virus morphogenesis. *World J Gastroenterol* 13, 65–73.
 - Bruss, V., and Ganem, D. (1991). The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1059–1063.
 - Buettner, R., Mora, L.B., and Jove, R. (2002). Activated STAT Signaling in Human Tumors Provides Novel Molecular Targets for Therapeutic Intervention. *Clin Cancer Res* 8, 945–954.
 - Bukh, J., Engle, R.E., Govindarajan, S., and Purcell, R.H. (2008). Immunity against the GBV-B hepatitis virus in tamarins can prevent productive infection following rechallenge and is long-lived. *J. Med. Virol.* 80, 87–94.
 - Buratti, E., Tisminetzky, S., Zotti, M., and Baralle, F.E. (1998). Functional analysis of the interaction between HCV 5'UTR and putative subunits of eukaryotic translation initiation factor eIF3. *Nucleic Acids Res* 26, 3179–3187.
 - Bureau, C., Bernad, J., Chaouche, N., Orfila, C., Béraud, M., Gonindard, C., Alric, L., Vinel, J.-P., and Pipy, B. (2001). Nonstructural 3 Protein of Hepatitis C Virus Triggers an Oxidative Burst in Human Monocytes via Activation of NADPH Oxidase. *J. Biol. Chem.* 276, 23077–23083.

Bibliographie

- Bushman, F.D., Malani, N., Fernandes, J., D'Orso, I., Cagney, G., Diamond, T.L., Zhou, H., Hazuda, D.J., Espeseth, A.S., König, R., et al. (2009). Host Cell Factors in HIV Replication: Meta-Analysis of Genome-Wide Studies. *PLOS Pathogens* 5, e1000437.
- Buster, E.H.C.J., Flink, H.J., Cakaloglu, Y., Simon, K., Trojan, J., Tabak, F., So, T.M.K., Feinman, S.V., Mach, T., Akarca, U.S., et al. (2008). Sustained HBeAg and HBsAg loss after long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with peginterferon alpha-2b. *Gastroenterology* 135, 459–467.
- Buti, M., Tsai, N., Petersen, J., Flisiak, R., Gurel, S., Krastev, Z., Aguilar Schall, R., Flaherty, J.F., Martins, E.B., Charuworn, P., et al. (2015). Seven-year efficacy and safety of treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B virus infection. *Dig. Dis. Sci.* 60, 1457–1464.
- Buti, M., Gane, E., Seto, W.K., Chan, H.L.Y., Chuang, W.-L., Stepanova, T., Hui, A.-J., Lim, Y.-S., Mehta, R., Janssen, H.L.A., et al. (2016). Tenofovir alafenamide versus tenofovir disoproxil fumarate for the treatment of patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B virus infection: a randomised, double-blind, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 1, 196–206.
- Cai, C., Zeng, J., Wu, H., Shi, R., Wei, M., Gao, Y., and Ma, W. (2015). Association between hepatitis B virus infection and diabetes mellitus: A meta-analysis. *Exp Ther Med* 10, 693–698.
- Caligiuri, M.A. (2008). Human natural killer cells. *Blood* 112, 461–469.
- Camus, G., Herker, E., Modi, A.A., Haas, J.T., Ramage, H.R., Farese, R.V., and Ott, M. (2013). Diacylglycerol acyltransferase-1 localizes hepatitis C virus NS5A protein to lipid droplets and enhances NS5A interaction with the viral capsid core. *J. Biol. Chem.* 288, 9915–9923.
- Cao, X., Ding, Q., Lu, J., Tao, W., Huang, B., Zhao, Y., Niu, J., Liu, Y.-J., and Zhong, J. (2015). MDA5 plays a critical role in interferon response during hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology* 62, 771–778.
- Capeding, M.R., Tran, N.H., Hadinegoro, S.R.S., Ismail, H.I.H.M., Chotpitayasunondh, T., Chua, M.N., Luong, C.Q., Rusmil, K., Wirawan, D.N., Nallusamy, R., et al. (2014). Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. *The Lancet* 384, 1358–1365.
- Capone, F., Guerriero, E., Colonna, G., Maio, P., Mangia, A., Castello, G., and Costantini, S. (2014). Cytokinome profile evaluation in patients with hepatitis C virus infection. *World J. Gastroenterol.* 20, 9261–9269.

Bibliographie

- Caselmann, W.H., and Koshy, R. (1998). Transactivators of hbv, signal transduction and tumorigenesis. In *Hepatitis B Virus*, (PUBLISHED BY IMPERIAL COLLEGE PRESS AND DISTRIBUTED BY WORLD SCIENTIFIC PUBLISHING CO.), pp. 161–181.
- Catanese, M.T., Ansuini, H., Graziani, R., Huby, T., Moreau, M., Ball, J.K., Paonessa, G., Rice, C.M., Cortese, R., Vitelli, A., et al. (2010). Role of scavenger receptor class B type I in hepatitis C virus entry: kinetics and molecular determinants. *J. Virol.* *84*, 34–43.
- Catanese, M.T., Uryu, K., Kopp, M., Edwards, T.J., Andrus, L., Rice, W.J., Silvestry, M., Kuhn, R.J., and Rice, C.M. (2013). Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *110*, 9505–9510.
- Ceci, M., Gaviraghi, C., Gorrini, C., Sala, L.A., Offenhäuser, N., Carlo Marchisio, P., and Biffo, S. (2003). Release of eIF6 (p27 BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. *Nature* *426*, 579–584.
- Ceci, M., Welshhans, K., Ciotti, M.T., Brandi, R., Parisi, C., Paoletti, F., Pistillo, L., Bassell, G.J., and Cattaneo, A. (2012). RACK1 Is a Ribosome Scaffold Protein for β -actin mRNA/ZBP1 Complex. *PLOS ONE* *7*, e35034.
- Chan, H.L.-Y., Wang, H., Niu, J., Chim, A.M.-L., and Sung, J.J.-Y. (2007). Two-year lamivudine treatment for hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B: a double-blind, placebo-controlled trial. *Antivir. Ther. (Lond.)* *12*, 345–353.
- Chan, H.L.Y., Fung, S., Seto, W.K., Chuang, W.-L., Chen, C.-Y., Kim, H.J., Hui, A.J., Janssen, H.L.A., Chowdhury, A., Tsang, T.Y.O., et al. (2016). Tenofovir alafenamide versus tenofovir disoproxil fumarate for the treatment of HBeAg-positive chronic hepatitis B virus infection: a randomised, double-blind, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol* *1*, 185–195.
- Chang, B.Y., Chiang, M., and Cartwright, C.A. (2001a). The Interaction of Src and RACK1 Is Enhanced by Activation of Protein Kinase C and Tyrosine Phosphorylation of RACK1. *J. Biol. Chem.* *276*, 20346–20356.
- Chang, B.Y., Harte, R.A., and Cartwright, C.A. (2002). RACK1: a novel substrate for the Src protein-tyrosine kinase. *Oncogene* *21*, 7619–7629.
- Chang, H.H.Y., Pannunzio, N.R., Adachi, N., and Lieber, M.R. (2017). Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *18*, 495–506.
- Chang, H.-M., Paulson, M., Holko, M., Rice, C.M., Williams, B.R.G., Marié, I., and Levy, D.E. (2004). Induction of interferon-stimulated gene expression and antiviral responses require protein deacetylase activity. *PNAS* *101*, 9578–9583.

Bibliographie

- Chang, K.-M., Thimme, R., Melpolder, J.J., Oldach, D., Pemberton, J., Moorhead-Loudis, J., McHutchison, J.G., Alter, H.J., and Chisari, F.V. (2001b). Differential CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responsiveness in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 33, 267–276.
- Chang, K.-S., Jiang, J., Cai, Z., and Luo, G. (2007). Human Apolipoprotein E Is Required for Infectivity and Production of Hepatitis C Virus in Cell Culture. *J Virol* 81, 13783–13793.
- Chang, L.-J., Pryciak, P., Ganem, D., and Varmus, H.E. (1989). Biosynthesis of the reverse transcriptase of hepatitis B viruses involves de novo translational initiation not ribosomal frameshifting. *Nature* 337, 364–368.
- Chattergoon, M.A., Levine, J.S., Latanich, R., Osburn, W.O., Thomas, D.L., and Cox, A.L. (2011). High plasma interleukin-18 levels mark the acute phase of hepatitis C virus infection. *J. Infect. Dis.* 204, 1730–1740.
- Chattergoon, M.A., Latanich, R., Quinn, J., Winter, M.E., Buckheit, R.W., Blankson, J.N., Pardoll, D., and Cox, A.L. (2014). HIV and HCV activate the inflammasome in monocytes and macrophages via endosomal Toll-like receptors without induction of type 1 interferon. *PLoS Pathog.* 10, e1004082.
- Chen, S.L., and Morgan, T.R. (2006). The Natural History of Hepatitis C Virus (HCV) Infection. *Int J Med Sci* 3, 47–52.
- Chen, H.-Y., Shen, D.-T., Ji, D.-Z., Han, P.-C., Zhang, W.-M., Ma, J.-F., Chen, W.-S., Goyal, H., Pan, S., and Xu, H.-G. (2018). Prevalence and burden of hepatitis D virus infection in the global population: a systematic review and meta-analysis. *Gut* gutjnl-2018-316601.
- Chen, M., Sällberg, M., Sönnernborg, A., Weiland, O., Mattsson, L., Jin, L., Birkett, A., Peterson, D., and Milich, D.R. (1999). Limited humoral immunity in hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 116, 135–143.
- Chen, W., Xu, Y., Li, H., Tao, W., Xiang, Y., Huang, B., Niu, J., Zhong, J., and Meng, G. (2014). HCV genomic RNA activates the NLRP3 inflammasome in human myeloid cells. *PLoS ONE* 9, e84953.
- Chen, Y., He, L., Peng, Y., Shi, X., Chen, J., Zhong, J., Chen, X., Cheng, G., and Deng, H. (2015). The hepatitis C virus protein NS3 suppresses TNF- α -stimulated activation of NF- κ B by targeting LUBAC. *Sci. Signal.* 8, ra118–ra118.
- Chen, Z., Cheng, Y., Xu, Y., Liao, J., Zhang, X., Hu, Y., Zhang, Q., Wang, J., Zhang, Z., Shen, F., et al. (2008). Expression profiles and function of Toll-like receptors 2 and 4 in peripheral blood mononuclear cells of chronic hepatitis B patients. *Clin. Immunol.* 128, 400–408.

Bibliographie

- Cheon, H., Holvey-Bates, E.G., Schoggins, J.W., Forster, S., Hertzog, P., Imanaka, N., Rice, C.M., Jackson, M.W., Junk, D.J., and Stark, G.R. (2013). IFN β -dependent increases in STAT1, STAT2, and IRF9 mediate resistance to viruses and DNA damage. *The EMBO Journal* 32, 2751–2763.
- Cherry, J.D., and Krogstad, P. (2004). SARS: the first pandemic of the 21st century. *Pediatr. Res.* 56, 1–5.
- Chi, X., Niu, Y., Cheng, M., Liu, X., Feng, Y., Zheng, F., Fan, J., Li, X., Jin, Q., Zhong, J., et al. (2016). Identification of a Potent and Broad-Spectrum Hepatitis C Virus Fusion Inhibitory Peptide from the E2 Stem Domain. *Scientific Reports* 6, 1–14.
- Chien, D.Y., Choo, Q.-L., Ralston, R., Spaete, R., Tong, M., Houghton, M., and Kuo, G. (1993). Persistence of HCV despite antibodies to both putative envelope glycoproteins. *The Lancet* 342, 933.
- Ching, W.M., Wychowski, C., Beach, M.J., Wang, H., Davies, C.L., Carl, M., Bradley, D.W., Alter, H.J., Feinstone, S.M., and Shih, J.W. (1992). Interaction of immune sera with synthetic peptides corresponding to the structural protein region of hepatitis C virus. *PNAS* 89, 3190–3194.
- Chisari, F.V., and Ferrari, C. (1995). Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 29–60.
- Cho, D.-Y., Yang, G.-H., Ryu, C.J., and Hong, H.J. (2003). Molecular chaperone GRP78/BiP interacts with the large surface protein of hepatitis B virus in vitro and in vivo. *J. Virol.* 77, 2784–2788.
- Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W., and Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244, 359–362.
- Choudhury, G.G. (2004). A Linear Signal Transduction Pathway Involving Phosphatidylinositol 3-Kinase, Protein Kinase C ϵ , and MAPK in Mesangial Cells Regulates Interferon- γ -induced STAT1 α Transcriptional Activation. *J. Biol. Chem.* 279, 27399–27409.
- Chu, D., Ren, S., Hu, S., Wang, W.G., Subramanian, A., Contreras, D., Kanagavel, V., Chung, E., Ko, J., Amirtham Jacob Appadorai, R.S., et al. (2013). Systematic analysis of enhancer and critical cis-acting RNA elements in the protein-encoding region of the hepatitis C virus genome. *J. Virol.* 87, 5678–5696.
- Churin, Y., Roderfeld, M., and Roeb, E. (2015). Hepatitis B virus large surface protein: function and fame. *Hepatobiliary Surg Nutr* 4, 1–10.

Bibliographie

- Clark, D.N., and Hu, J. (2015). Unveiling the roles of HBV polymerase for new antiviral strategies. *Future Virol* 10, 283–295.
- Coller, K.E., Berger, K.L., Heaton, N.S., Cooper, J.D., Yoon, R., and Randall, G. (2009). RNA interference and single particle tracking analysis of hepatitis C virus endocytosis. *PLoS Pathog.* 5, e1000702.
- Collins, S.E., Noyce, R.S., and Mossman, K.L. (2004). Innate Cellular Response to Virus Particle Entry Requires IRF3 but Not Virus Replication. *Journal of Virology* 78, 1706–1717.
- Corado, J., Toro, F., Rivera, H., Bianco, N.E., Deibis, L., and Sanctis, J.B.D. (1997). Impairment of natural killer (NK) cytotoxic activity in hepatitis C virus (HCV) infection. *Clinical & Experimental Immunology* 109, 451–457.
- Cougot, D., Wu, Y., Cairo, S., Caramel, J., Renard, C.-A., Lévy, L., Buendia, M.A., and Neuveut, C. (2007). The hepatitis B virus X protein functionally interacts with CREB-binding protein/p300 in the regulation of CREB-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* 282, 4277–4287.
- Cougot, D., Allemand, E., Rivière, L., Benhenda, S., Duroire, K., Levillayer, F., Muchardt, C., Buendia, M.-A., and Neuveut, C. (2012). Inhibition of PP1 phosphatase activity by HBx: a mechanism for the activation of hepatitis B virus transcription. *Sci Signal* 5, ra1.
- Coyle, S.M., Gilbert, W.V., and Doudna, J.A. (2009). Direct link between RACK1 function and localization at the ribosome in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 29, 1626–1634.
- Craig, A.W., Svitkin, Y.V., Lee, H.S., Belsham, G.J., and Sonenberg, N. (1997). The La autoantigen contains a dimerization domain that is essential for enhancing translation. *Mol. Cell. Biol.* 17, 163–169.
- Crotta, S., Stilla, A., Wack, A., D’Andrea, A., Nuti, S., D’Oro, U., Mosca, M., Filliponi, F., Brunetto, R.M., Bonino, F., et al. (2002). Inhibition of Natural Killer Cells through Engagement of CD81 by the Major Hepatitis C Virus Envelope Protein. *J Exp Med* 195, 35–42.
- Crouchet, E., Wrensch, F., Schuster, C., Zeisel, M.B., and Baumert, T.F. (2018). Host-targeting therapies for hepatitis C virus infection: current developments and future applications. *Therap Adv Gastroenterol* 11, 1756284818759483.
- Crowther, R.A., Kiselev, N.A., Böttcher, B., Berriman, J.A., Borisova, G.P., Ose, V., and Pumpens, P. (1994). Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell* 77, 943–950.
- Da Villa, G. (2000). Rationale for the infant and adolescent vaccination programmes in

- Italy. *Vaccine 18 Suppl 1*, S31-4.
- Dabo, S., and Meurs, E.F. (2012). dsRNA-Dependent Protein Kinase PKR and its Role in Stress, Signaling and HCV Infection. *Viruses 4*, 2598–2635.
 - Dai, B., Chen, A.Y., Corkum, C.P., Peroutka, R.J., Landon, A., Houng, S., Muniandy, P.A., Zhang, Y., Lehrmann, E., Mazan-Mamczarz, K., et al. (2016). Hepatitis C virus upregulates B-cell receptor signaling: a novel mechanism for HCV-associated B-cell lymphoproliferative disorders. *Oncogene 35*, 2979–2990.
 - Dane, D.S., Cameron, C.H., and Briggs, M. (1970). Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet 1*, 695–698.
 - Daniyal, M., Akram, M., Hamid, A., Nawaz, A., Usmanghani, K., Ahmed, S., and Hameed, L. (2016). Review: Comprehensive review on treatment of HIV. *Pak J Pharm Sci 29*, 1331–1338.
 - Dao Thi, V.L., Granier, C., Zeisel, M.B., Guérin, M., Mancip, J., Granio, O., Penin, F., Lavillette, D., Bartenschlager, R., Baumert, T.F., et al. (2012). Characterization of hepatitis C virus particle subpopulations reveals multiple usage of the scavenger receptor BI for entry steps. *J. Biol. Chem. 287*, 31242–31257.
 - David, M., Chen, H.E., Goelz, S., Larner, A.C., and Neel, B.G. (1995). Differential regulation of the alpha/beta interferon-stimulated Jak/Stat pathway by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1. *Molecular and Cellular Biology 15*, 7050–7058.
 - David, N., Yaffe, Y., Hagoel, L., Elazar, M., Glenn, J.S., Hirschberg, K., and Sklan, E.H. (2015). The interaction between the hepatitis C proteins NS4B and NS5A is involved in viral replication. *Virology 475*, 139–149.
 - Davies, W.L., Grunert, R.R., Haff, R.F., Mcgahen, J.W., Neumayer, E.M., Paulshock, M., Watts, J.C., Wood, T.R., Hermann, E.C., and Hoffmann, C.E. (1964). ANTIVIRAL ACTIVITY OF 1-ADAMANTANAMINE (AMANTADINE). *Science 144*, 862–863.
 - Davis, J.P. (2005). Experience with hepatitis A and B vaccines. *Am. J. Med. 118 Suppl 10A*, 7S-15S.
 - Dawood, R.M., El-Meguid, M.A., Ibrahim, M.K., Bader El Din, N.G., Barakat, A., El-Wakeel, K., Alla, M.D.A.A., Wu, G.Y., and El Awady, M.K. (2018). Dysregulation of fibrosis related genes in HCV induced liver disease. *Gene 664*, 58–69.
 - De Andrade, K.Q., Moura, F.A., Dos Santos, J.M., De Araújo, O.R.P., De Farias Santos, J.C., and Goulart, M.O.F. (2015). Oxidative Stress and Inflammation in Hepatic Diseases: Therapeutic Possibilities of N-Acetylcysteine. *International Journal of Molecular Sciences 16*, 30269–30308.

Bibliographie

- Deb, D.K., Sassano, A., Lekmine, F., Majchrzak, B., Verma, A., Kambhampati, S., Uddin, S., Rahman, A., Fish, E.N., and Plataniias, L.C. (2003). Activation of Protein Kinase C δ by IFN- γ . *The Journal of Immunology* *171*, 267–273.
- Decorsière, A., Mueller, H., van Breugel, P.C., Abdul, F., Gerossier, L., Beran, R.K., Livingston, C.M., Niu, C., Fletcher, S.P., Hantz, O., et al. (2016). Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor. *Nature* *531*, 386–389.
- Del Vecchio, I., Zuccotti, A., Pisano, F., Canneva, F., Lenzken, S.C., Rousset, F., Corsini, E., Govoni, S., and Racchi, M. (2009). “Functional mapping of the promoter region of the GNB2L1 human gene coding for RACK1 scaffold protein.” *Gene* *430*, 17–29.
- Delius, H., Gough, N.M., Cameron, C.H., and Murray, K. (1983). Structure of the hepatitis B virus genome. *J. Virol.* *47*, 337–343.
- Demirov, D., Gabriel, G., Schneider, C., Hohenberg, H., and Ludwig, S. (2012). Interaction of influenza A virus matrix protein with RACK1 is required for virus release. *Cell. Microbiol.* *14*, 774–789.
- Deng, G., Ge, J., Liu, C., Pang, J., Huang, Z., Peng, J., Sun, J., Hou, J., and Zhang, X. (2017). Impaired expression and function of TLR8 in chronic HBV infection and its association with treatment responses during peg-IFN- α -2a antiviral therapy. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* *41*, 386–398.
- Deng, Y.-Z., Yao, F., Li, J.-J., Mao, Z.-F., Hu, P.-T., Long, L.-Y., Li, G., Ji, X.-D., Shi, S., Guan, D.-X., et al. (2012). RACK1 suppresses gastric tumorigenesis by stabilizing the β -catenin destruction complex. *Gastroenterology* *142*, 812-823.e15.
- Devhare, P.B., Sasaki, R., Shrivastava, S., Di Bisceglie, A.M., Ray, R., and Ray, R.B. (2017). Exosome-Mediated Intercellular Communication between Hepatitis C Virus-Infected Hepatocytes and Hepatic Stellate Cells. *J. Virol.* *91*.
- Di Lorenzo, C., Angus, A.G.N., and Patel, A.H. (2011). Hepatitis C Virus Evasion Mechanisms from Neutralizing Antibodies. *Viruses* *3*, 2280–2300.
- Diao, J., Pantua, H., Ngu, H., Komuves, L., Diehl, L., Schaefer, G., and Kapadia, S.B. (2012). Hepatitis C virus induces epidermal growth factor receptor activation via CD81 binding for viral internalization and entry. *J. Virol.* *86*, 10935–10949.
- Ding, Q., Cao, X., Lu, J., Huang, B., Liu, Y.-J., Kato, N., Shu, H.-B., and Zhong, J. (2013). Hepatitis C virus NS4B blocks the interaction of STING and TBK1 to evade host innate immunity. *J. Hepatol.* *59*, 52–58.
- Dolganiuc, A., Oak, S., Kodys, K., Golenbock, D.T., Finberg, R.W., Kurt-Jones, E., and Szabo, G. (2004). Hepatitis C core and nonstructural 3 proteins trigger toll-like receptor 2-

- mediated pathways and inflammatory activation. *Gastroenterology* 127, 1513–1524.
- Dorn, C., Engelmann, J.C., Saugspier, M., Koch, A., Hartmann, A., Müller, M., Spang, R., Bosserhoff, A., and Hellerbrand, C. (2014). Increased expression of c-Jun in nonalcoholic fatty liver disease. *Laboratory Investigation* 94, 394–408.
 - Dorner, M., Horwitz, J.A., Donovan, B.M., Labitt, R.N., Budell, W.C., Friling, T., Vogt, A., Catanese, M.T., Satoh, T., Kawai, T., et al. (2013). Completion of the entire hepatitis C virus life cycle in genetically humanized mice. *Nature* 501, 237–241.
 - Dorr, P., Westby, M., Dobbs, S., Griffin, P., Irvine, B., Macartney, M., Mori, J., Rickett, G., Smith-Burchnell, C., Napier, C., et al. (2005). Maraviroc (UK-427,857), a Potent, Orally Bioavailable, and Selective Small-Molecule Inhibitor of Chemokine Receptor CCR5 with Broad-Spectrum Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49, 4721–4732.
 - Dreux, M., Garaigorta, U., Boyd, B., Décembre, E., Chung, J., Whitten-Bauer, C., Wieland, S., and Chisari, F.V. (2012). Short-Range Exosomal Transfer of Viral RNA from Infected Cells to Plasmacytoid Dendritic Cells Triggers Innate Immunity. *Cell Host & Microbe* 12, 558–570.
 - Dryden, K.A., Wieland, S.F., Whitten-Bauer, C., Gerin, J.L., Chisari, F.V., and Yeager, M. (2006). Native Hepatitis B Virions and Capsids Visualized by Electron Cryomicroscopy. *Molecular Cell* 22, 843–850.
 - Du, X., Pan, T., Xu, J., Zhang, Y., Song, W., Yi, Z., and Yuan, Z. (2016). Hepatitis C virus replicative double-stranded RNA is a potent interferon inducer that triggers interferon production through MDA5. *J. Gen. Virol.* 97, 2868–2882.
 - Dubuisson, J., Hsu, H.H., Cheung, R.C., Greenberg, H.B., Russell, D.G., and Rice, C.M. (1994). Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J. Virol.* 68, 6147–6160.
 - Durand, T., Di Liberto, G., Colman, H., Cammas, A., Boni, S., Marcellin, P., Cahour, A., Vagner, S., and Féray, C. (2010). Occult infection of peripheral B cells by hepatitis C variants which have low translational efficiency in cultured hepatocytes. *Gut* 59, 934–942.
 - Dutkiewicz, M., Swiatkowska, A., Figlerowicz, M., and Ciesiołka, J. (2008). Structural domains of the 3'-terminal sequence of the hepatitis C virus replicative strand. *Biochemistry* 47, 12197–12207.
 - Eble, B.E., MacRae, D.R., Lingappa, V.R., and Ganem, D. (1987). Multiple topogenic sequences determine the transmembrane orientation of the hepatitis B surface antigen. *Mol Cell Biol* 7, 3591–3601.

- Eble, B.E., Lingappa, V.R., and Ganem, D. (1990). The N-terminal (pre-S2) domain of a hepatitis B virus surface glycoprotein is translocated across membranes by downstream signal sequences. *J. Virol.* *64*, 1414–1419.
- Edlin, B.R., Eckhardt, B.J., Shu, M.A., Holmberg, S.D., and Swan, T. (2015). Toward a more accurate estimate of the prevalence of hepatitis C in the United States. *Hepatology* *62*, 1353–1363.
- Egger, D., Wölk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H.E., Moradpour, D., and Bienz, K. (2002). Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J. Virol.* *76*, 5974–5984.
- Eller, C., Heydmann, L., Colpitts, C.C., El Saghire, H., Piccioni, F., Jühling, F., Majzoub, K., Pons, C., Bach, C., Lucifora, J., et al. (2020). A genome-wide gain-of-function screen identifies CDKN2C as a HBV host factor. *Nat Commun* *11*, 2707.
- Elsaesser, H., Sauer, K., and Brooks, D.G. (2009). IL-21 Is Required to Control Chronic Viral Infection. *Science* *324*, 1569–1572.
- Evans, M.J., von Hahn, T., Tscherne, D.M., Syder, A.J., Panis, M., Wölk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J.A., Bieniasz, P.D., and Rice, C.M. (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* *446*, 801–805.
- Farag, N.S., Breitingner, U., El-Azizi, M., and Breitingner, H.-G. (2017). The p7 viroporin of the hepatitis C virus contributes to liver inflammation by stimulating production of Interleukin-1 β . *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* *1863*, 712–720.
- Farci, P., Alter, H.J., Wong, D.C., Miller, R.H., Govindarajan, S., Engle, R., Shapiro, M., and Purcell, R.H. (1994). Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. *PNAS* *91*, 7792–7796.
- Farci, P., Shimoda, A., Wong, D., Cabezon, T., De Gioannis, D., Strazzera, A., Shimizu, Y., Shapiro, M., Alter, H.J., and Purcell, R.H. (1996). Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *93*, 15394–15399.
- Farci, P., Shimoda, A., Coiana, A., Diaz, G., Peddis, G., Melpolder, J.C., Strazzera, A., Chien, D.Y., Munoz, S.J., Balestrieri, A., et al. (2000). The Outcome of Acute Hepatitis C Predicted by the Evolution of the Viral Quasispecies. *Science* *288*, 339–344.
- Farquhar, M.J., Hu, K., Harris, H.J., Davis, C., Brimacombe, C.L., Fletcher, S.J., Baumert, T.F., Rappoport, J.Z., Balfe, P., and McKeating, J.A. (2012). Hepatitis C virus induces CD81 and claudin-1 endocytosis. *J. Virol.* *86*, 4305–4316.
- Farza, H., Hadchouel, M., Scotto, J., Tiollais, P., Babinet, C., and Pourcel, C. (1988).

- Replication and gene expression of hepatitis B virus in a transgenic mouse that contains the complete viral genome. *J Virol* 62, 4144–4152.
- Fauvelle, C., Felmler, D.J., Crouchet, E., Lee, J., Heydmann, L., Lefèvre, M., Magri, A., Hiet, M.-S., Fofana, I., Habersetzer, F., et al. (2016). Apolipoprotein E Mediates Evasion From Hepatitis C Virus Neutralizing Antibodies. *Gastroenterology* 150, 206-217.e4.
 - Feinstone, S.M., Kapikian, A.Z., Purcell, R.H., Alter, H.J., and Holland, P.V. (1975). Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N. Engl. J. Med.* 292, 767–770.
 - Feinstone, S.M., Mihalik, K.B., Kamimura, T., Alter, H.J., London, W.T., and Purcell, R.H. (1983). Inactivation of hepatitis B virus and non-A, non-B hepatitis by chloroform. *Infect Immun* 41, 816–821.
 - Fernholz, D., Galle, P.R., Stemler, M., Brunetto, M., Bonino, F., and Will, H. (1993). Infectious hepatitis B virus variant defective in pre-S2 protein expression in a chronic carrier. *Virology* 194, 137–148.
 - Ferrari, E., He, Z., Palermo, R.E., and Huang, H.-C. (2008). Hepatitis C Virus NS5B Polymerase Exhibits Distinct Nucleotide Requirements for Initiation and Elongation. *J Biol Chem* 283, 33893–33901.
 - Filbin, M.E., Vollmar, B.S., Shi, D., Gonen, T., and Kieft, J.S. (2013). HCV IRES manipulates the ribosome to promote the switch from translation initiation to elongation. *Nature Structural & Molecular Biology* 20, 150–158.
 - Fink, K., and Grandvaux, N. (2013). STAT2 and IRF9. *JAK-STAT* 2, e27521.
 - Fitzgerald, K.A., McWhirter, S.M., Faia, K.L., Rowe, D.C., Latz, E., Golenbock, D.T., Coyle, A.J., Liao, S.-M., and Maniatis, T. (2003). IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat. Immunol.* 4, 491–496.
 - Florimond, A., Chouteau, P., Bruscella, P., Le Seyec, J., Mérour, E., Ahnou, N., Mallat, A., Lotersztajn, S., and Pawlotsky, J.-M. (2015). Human hepatic stellate cells are not permissive for hepatitis C virus entry and replication. *Gut* 64, 957–965.
 - Fontenau, L. (2019). Évolution de la couverture vaccinale du vaccin contre le papillomavirus en France – 2008-2018. *Santé Publique France BEH* 22-23.
 - Fricke, M., Dünnes, N., Zayas, M., Bartenschlager, R., Niepmann, M., and Marz, M. (2015). Conserved RNA secondary structures and long-range interactions in hepatitis C viruses. *RNA* 21, 1219–1232.
 - Friebe, P., and Bartenschlager, R. (2009). Role of RNA structures in genome terminal sequences of the hepatitis C virus for replication and assembly. *J. Virol.* 83, 11989–11995.

Bibliographie

- Friebe, P., Boudet, J., Simorre, J.-P., and Bartenschlager, R. (2005). Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *J. Virol.* 79, 380–392.
- Fuest, M., Willim, K., MacNelly, S., Fellner, N., Resch, G.P., Blum, H.E., and Hasselblatt, P. (2012). The transcription factor c-Jun protects against sustained hepatic endoplasmic reticulum stress thereby promoting hepatocyte survival. *Hepatology* 55, 408–418.
- Fung, J., Lai, C.-L., Seto, W.-K., and Yuen, M.-F. (2011). Nucleoside/nucleotide analogues in the treatment of chronic hepatitis B. *J Antimicrob Chemother* 66, 2715–2725.
- Galani, I.E., Koltsida, O., and Andreakos, E. (2015). Type III interferons (IFNs): Emerging Master Regulators of Immunity. In *Crossroads Between Innate and Adaptive Immunity V*, S.P. Schoenberger, P.D. Katsikis, and B. Pulendran, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 1–15.
- Gale, M.J., Korth, M.J., Tang, N.M., Tan, S.L., Hopkins, D.A., Dever, T.E., Polyak, S.J., Gretch, D.R., and Katze, M.G. (1997). Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 230, 217–227.
- Gale, M.J., Korth, M.J., and Katze, M.G. (1998). Repression of the PKR protein kinase by the hepatitis C virus NS5A protein: a potential mechanism of interferon resistance. *Clin Diagn Virol* 10, 157–162.
- Gallucci, L., and Kann, M. (2017). Nuclear Import of Hepatitis B Virus Capsids and Genome. *Viruses* 9.
- Gandin, V., Senft, D., Topisirovic, I., and Ronai, Z.A. (2013). RACK1 Function in Cell Motility and Protein Synthesis. *Genes Cancer* 4, 369–377.
- Gao, L., Aizaki, H., He, J.-W., and Lai, M.M.C. (2004). Interactions between Viral Nonstructural Proteins and Host Protein hVAP-33 Mediate the Formation of Hepatitis C Virus RNA Replication Complex on Lipid Raft. *Journal of Virology* 78, 3480–3488.
- Garaigorta, U., and Chisari, F.V. (2009). Hepatitis C virus blocks interferon effector function by inducing protein kinase R phosphorylation. *Cell Host Microbe* 6, 513–522.
- Gastaminza, P., Cheng, G., Wieland, S., Zhong, J., Liao, W., and Chisari, F.V. (2008). Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J. Virol.* 82, 2120–2129.
- Gavilanes, F., Gonzalez-Ros, J.M., and Peterson, D.L. (1982). Structure of hepatitis B surface antigen. Characterization of the lipid components and their association with the viral proteins. *J. Biol. Chem.* 257, 7770–7777.

Bibliographie

- Gentsch, J., Brohm, C., Steinmann, E., Friesland, M., Menzel, N., Vieyres, G., Perin, P.M., Frentzen, A., Kaderali, L., and Pietschmann, T. (2013). hepatitis c Virus p7 is critical for capsid assembly and envelopment. *PLoS Pathog.* 9, e1003355.
- Ghouri, Y.A., Mian, I., and Rowe, J.H. (2017). Review of hepatocellular carcinoma: Epidemiology, etiology, and carcinogenesis. *Journal of Carcinogenesis* 16, 1.
- Girard, M.P., Tam, J.S., Assossou, O.M., and Kieny, M.P. (2010). The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review. *Vaccine* 28, 4895–4902.
- Gish, R.G., Lok, A.S., Chang, T.-T., de Man, R.A., Gadano, A., Sollano, J., Han, K.-H., Chao, Y.-C., Lee, S.-D., Harris, M., et al. (2007). Entecavir therapy for up to 96 weeks in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 133, 1437–1444.
- Glebe, D., and Urban, S. (2007). Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J. Gastroenterol.* 13, 22–38.
- Glebe, D., Urban, S., Knoop, E.V., Cag, N., Krass, P., Grün, S., Bulavaite, A., Sasnauskas, K., and Gerlich, W.H. (2005). Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting preS1 lipopeptides and tupaia hepatocytes. *Gastroenterology* 129, 234–245.
- GLOBOCAN (2018). Cancer today.
- Golden-Mason, L., and Rosen, H.R. (2006). Natural killer cells: Primary target for hepatitis C virus immune evasion strategies? *Liver Transplantation* 12, 363–372.
- Gong, G., Waris, G., Tanveer, R., and Siddiqui, A. (2001). Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF- κ B. *PNAS* 98, 9599–9604.
- Gough, D.J., Sabapathy, K., Ko, E.Y.-N., Arthur, H.A., Schreiber, R.D., Trapani, J.A., Clarke, C.J.P., and Johnstone, R.W. (2007). A novel c-Jun-dependent signal transduction pathway necessary for the transcriptional activation of interferon gamma response genes. *J. Biol. Chem.* 282, 938–946.
- Gouttenoire, J., Castet, V., Montserret, R., Arora, N., Raussens, V., Ruyschaert, J.-M., Diesis, E., Blum, H.E., Penin, F., and Moradpour, D. (2009). Identification of a novel determinant for membrane association in hepatitis C virus nonstructural protein 4B. *J. Virol.* 83, 6257–6268.
- Gouttenoire, J., Penin, F., and Moradpour, D. (2010). Hepatitis C virus nonstructural protein 4B: a journey into unexplored territory. *Rev. Med. Virol.* 20, 117–129.
- Grakoui, A., Shoukry, N.H., Woollard, D.J., Han, J.-H., Hanson, H.L., Ghayeb, J., Murthy, K.K., Rice, C.M., and Walker, C.M. (2003). HCV Persistence and Immune Evasion in the

Bibliographie

- Absence of Memory T Cell Help. *Science* 302, 659–662.
- Grandvaux, N., Servant, M.J., tenOever, B., Sen, G.C., Balachandran, S., Barber, G.N., Lin, R., and Hiscott, J. (2002). Transcriptional Profiling of Interferon Regulatory Factor 3 Target Genes: Direct Involvement in the Regulation of Interferon-Stimulated Genes. *Journal of Virology* 76, 5532–5539.
 - Gripon, P., Le Seyec, J., Rumin, S., and Guguen-Guillouzo, C. (1995). Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity. *Virology* 213, 292–299.
 - Groepper, C., Ruffinatscha, K., Schröder, N., Stindt, S., Ehlting, C., Albrecht, U., Bock, H.H., Bartenschlager, R., Häussinger, D., and Bode, J.G. (2018). HCV modifies EGF signalling and upregulates production of CXCR2 ligands: Role in inflammation and antiviral immune response. *Journal of Hepatology* 69, 594–602.
 - Grosso, S., Volta, V., Sala, L.A., Vietri, M., Marchisio, P.C., Ron, D., and Biffo, S. (2008). PKC β II modulates translation independently from mTOR and through RACK1. *Biochem J* 415, 77–85.
 - Guidotti, L.G., and Chisari, F.V. (2001). Noncytolytic Control of Viral Infections by the Innate and Adaptive Immune Response. *Annual Review of Immunology* 19, 65–91.
 - Günthard, H.F., Saag, M.S., Benson, C.A., del Rio, C., Eron, J.J., Gallant, J.E., Hoy, J.F., Mugavero, M.J., Sax, P.E., Thompson, M.A., et al. (2016). Antiretroviral Drugs for Treatment and Prevention of HIV Infection in Adults. *JAMA* 316, 191–210.
 - Guo, Y., Wang, W., Wang, J., Feng, J., Wang, Q., Jin, J., Lv, M., Li, X., Li, Y., Ma, Y., et al. (2013). Receptor for activated C kinase 1 promotes hepatocellular carcinoma growth by enhancing mitogen-activated protein kinase kinase 7 activity. *Hepatology* 57, 140–151.
 - Guy, C.S., Mulrooney-Cousins, P.M., Churchill, N.D., and Michalak, T.I. (2008). Intrahepatic expression of genes affiliated with innate and adaptive immune responses immediately after invasion and during acute infection with woodchuck hepadnavirus. *J. Virol.* 82, 8579–8591.
 - Habig, J.W., and Loeb, D.D. (2006). Sequence identity of the direct repeats, DR1 and DR2, contributes to the discrimination between primer translocation and in situ priming during replication of the duck hepatitis B virus. *J. Mol. Biol.* 364, 32–43.
 - Hadziyannis, S.J., Tassopoulos, N.C., Heathcote, E.J., Chang, T.-T., Kitis, G., Rizzetto, M., Marcellin, P., Lim, S.G., Goodman, Z., Ma, J., et al. (2006). Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B for up to 5 years. *Gastroenterology* 131, 1743–1751.

Bibliographie

- Hafirassou, M.L., Meertens, L., Umaña-Díaz, C., Labeau, A., Dejarnac, O., Bonnet-Madin, L., Kümmerer, B.M., Delaugerre, C., Roingard, P., Vidalain, P.-O., et al. (2017). A Global Interactome Map of the Dengue Virus NS1 Identifies Virus Restriction and Dependency Host Factors. *Cell Rep* 21, 3900–3913.
- von Hahn, T., Yoon, J.C., Alter, H., Rice, C.M., Rehmann, B., Balfe, P., and McKeating, J.A. (2007). Hepatitis C Virus Continuously Escapes From Neutralizing Antibody and T-Cell Responses During Chronic Infection In Vivo. *Gastroenterology* 132, 667–678.
- Haines, K.M., and Loeb, D.D. (2007). The sequence of the RNA primer and the DNA template influence the initiation of plus-strand DNA synthesis in hepatitis B virus. *J. Mol. Biol.* 370, 471–480.
- Han, J., Perez, J.T., Chen, C., Li, Y., Benitez, A., Kandasamy, M., Lee, Y., Andrade, J., tenOever, B., and Manicassamy, B. (2018). Genome-wide CRISPR/Cas9 Screen Identifies Host Factors Essential for Influenza Virus Replication. *Cell Reports* 23, 596–607.
- Hao, L., Sakurai, A., Watanabe, T., Sorensen, E., Nidom, C.A., Newton, M.A., Ahlquist, P., and Kawaoka, Y. (2008). Drosophila RNAi screen identifies host genes important for influenza virus replication. *Nature* 454, 890–893.
- Harada, H., Takahashi, E., Itoh, S., Harada, K., Hori, T.A., and Taniguchi, T. (1994). Structure and regulation of the human interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 genes: implications for a gene network in the interferon system. *Molecular and Cellular Biology* 14, 1500–1509.
- Harak, C., and Lohmann, V. (2015). Ultrastructure of the replication sites of positive-strand RNA viruses. *Virology* 479–480, 418–433.
- Haro, T., Shimoda, K., Kakumitsu, H., Kamezaki, K., Numata, A., Ishikawa, F., Sekine, Y., Muromoto, R., Matsuda, T., and Harada, M. (2004). Tyrosine Kinase 2 Interacts with and Phosphorylates Receptor for Activated C Kinase-1, a WD Motif-Containing Protein. *The Journal of Immunology* 173, 1151–1157.
- Harper, D.M., and DeMars, L.R. (2017). HPV vaccines – A review of the first decade. *Gynecologic Oncology* 146, 196–204.
- Harrus, D., Ahmed-El-Sayed, N., Simister, P.C., Miller, S., Triconnet, M., Hagedorn, C.H., Mahias, K., Rey, F.A., Astier-Gin, T., and Bressanelli, S. (2010). Further insights into the roles of GTP and the C terminus of the hepatitis C virus polymerase in the initiation of RNA synthesis. *J. Biol. Chem.* 285, 32906–32918.
- Hartl, F.U., Bracher, A., and Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475, 324–332.

Bibliographie

- Harvey, R.A., PhD, R.A.H., Harvey, R.P., and Rosenthal, N. (1999). *Heart Development* (Gulf Professional Publishing).
- Hasan, S., Ahmad, S.A., Masood, R., and Saeed, S. (2019). Ebola virus: A global public health menace: A narrative review. *J Family Med Prim Care* 8, 2189–2201.
- Hassan, M., Selimovic, D., Ghozlan, H., and Abdel-kader, O. (2009). Hepatitis C virus core protein triggers hepatic angiogenesis by a mechanism including multiple pathways. *Hepatology* 49, 1469–1482.
- Hayden, F.G. (2001). Perspectives on antiviral use during pandemic influenza. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 356, 1877–1884.
- Hayden, F.G., Sugaya, N., Hirotsu, N., Lee, N., de Jong, M.D., Hurt, A.C., Ishida, T., Sekino, H., Yamada, K., Portsmouth, S., et al. (2018). Baloxavir Marboxil for Uncomplicated Influenza in Adults and Adolescents. *N. Engl. J. Med.* 379, 913–923.
- Hayes, C.N., Zhang, Y., Makokha, G.N., Hasan, M.Z., Omokoko, M.D., and Chayama, K. (2016). Early events in hepatitis B virus infection: From the cell surface to the nucleus. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 31, 302–309.
- He, C.-L., Liu, M., Tan, Z.-X., Hu, Y.-J., Zhang, Q.-Y., Kuang, X.-M., Kong, W.-L., and Mao, Q. (2018). Hepatitis C virus core protein-induced miR-93-5p up-regulation inhibits interferon signaling pathway by targeting IFNAR1. *World J. Gastroenterol.* 24, 226–236.
- He, L.F., Alling, D., Popkin, T., Shapiro, M., Alter, H.J., and Purcell, R.H. (1987). Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration. *J. Infect. Dis.* 156, 636–640.
- He, R., Yu, Z., Zhang, R., and Zhang, Z. (2014). Protein tyrosine phosphatases as potential therapeutic targets. *Acta Pharmacologica Sinica* 35, 1227–1246.
- Heermann, K.H., Goldmann, U., Schwartz, W., Seyffarth, T., Baumgarten, H., and Gerlich, W.H. (1984). Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J. Virol.* 52, 396–402.
- Henderson, A.J., Zou, X., and Calame, K.L. (1995). C/EBP proteins activate transcription from the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat in macrophages/monocytes. *J. Virol.* 69, 5337–5344.
- Herker, E., Harris, C., Hernandez, C., Carpentier, A., Kaehlcke, K., Rosenberg, A.R., Farese, R.V., and Ott, M. (2010). Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nat. Med.* 16, 1295–1298.
- Herrscher, C., Pastor, F., Burlaud-Gaillard, J., Dumans, A., Seigneuret, F., Moreau, A., Patient, R., Eymieux, S., Rocquigny, H. de, Hourieux, C., et al. (2020). Hepatitis B virus

- entry into HepG2-NTCP cells requires clathrin-mediated endocytosis. *Cellular Microbiology* 22, e13205.
- Herzog, K., Bandiera, S., Pernot, S., Fauvelle, C., Jühling, F., Weiss, A., Bull, A., Durand, S.C., Chane-Woon-Ming, B., Pfeffer, S., et al. (2020). Functional microRNA screen uncovers O-linked N-acetylglucosamine transferase as a host factor modulating hepatitis C virus morphogenesis and infectivity. *Gut* 69, 380–392.
 - Hiet, M.-S., Bauhofer, O., Zayas, M., Roth, H., Tanaka, Y., Schirmacher, P., Willemsen, J., Grünvogel, O., Bender, S., Binder, M., et al. (2015). Control of temporal activation of hepatitis C virus-induced interferon response by domain 2 of nonstructural protein 5A. *Journal of Hepatology* 63, 829–837.
 - Hilton, S., Patterson, C., Smith, E., Bedford, H., and Hunt, K. (2013). Teenagers' understandings of and attitudes towards vaccines and vaccine-preventable diseases: A qualitative study. *Vaccine* 31, 2543–2550.
 - Hishiki, T., Shimizu, Y., Tobita, R., Sugiyama, K., Ogawa, K., Funami, K., Ohsaki, Y., Fujimoto, T., Takaku, H., Wakita, T., et al. (2010). Infectivity of Hepatitis C Virus Is Influenced by Association with Apolipoprotein E Isoforms. *J Virol* 84, 12048–12057.
 - Hoeve, J. ten, Ibarra-Sanchez, M. de J., Fu, Y., Zhu, W., Tremblay, M., David, M., and Shuai, K. (2002). Identification of a Nuclear Stat1 Protein Tyrosine Phosphatase. *Molecular and Cellular Biology* 22, 5662–5668.
 - Holbrook, M.R. (2017). Historical Perspectives on Flavivirus Research. *Viruses* 9, 97.
 - Hollinger, F.B., Gitnick, G.L., Aach, R.D., Szmuness, W., Mosley, J.W., Stevens, C.E., Peters, R.L., Weiner, J.M., Werch, J.B., and Lander, J.J. (1978). Non-A, non-B hepatitis transmission in chimpanzees: a project of the transfusion-transmitted viruses study group. *Intervirology* 10, 60–68.
 - Hollinger, F.B., Mosley, J.W., Szmuness, W., Aach, R.D., Peters, R.L., and Stevens, C. (1980). Transfusion-transmitted viruses study: experimental evidence for two non-A, non-B, hepatitis agents. *J. Infect. Dis.* 142, 400–407.
 - Holm, C.K., Rahbek, S.H., Gad, H.H., Bak, R.O., Jakobsen, M.R., Jiang, Z., Hansen, A.L., Jensen, S.K., Sun, C., Thomsen, M.K., et al. (2016). Influenza A virus targets a cGAS-independent STING pathway that controls enveloped RNA viruses. *Nature Communications* 7, 1–9.
 - Hong, X., Kim, E.S., and Guo, H. (2017a). Epigenetic regulation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA: Implications for epigenetic therapy against chronic hepatitis B. *Hepatology* 66, 2066–2077.

Bibliographie

- Hong, Y.S., Chang, Y., Ryu, S., Cainzos-Achirica, M., Kwon, M.-J., Zhang, Y., Choi, Y., Ahn, J., Rampal, S., Zhao, D., et al. (2017b). Hepatitis B and C virus infection and diabetes mellitus: A cohort study. *Sci Rep* 7.
- Honigwachs, J., Faktor, O., Dikstein, R., Shaul, Y., and Laub, O. (1989). Liver-specific expression of hepatitis B virus is determined by the combined action of the core gene promoter and the enhancer. *J. Virol.* 63, 919–924.
- Horner, S.M., Liu, H.M., Park, H.S., Briley, J., and Gale, M. (2011). Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 14590–14595.
- Hosui, A., Ohkawa, K., Ishida, H., Sato, A., Nakanishi, F., Ueda, K., Takehara, T., Kasahara, A., Sasaki, Y., Hori, M., et al. (2003). Hepatitis C Virus Core Protein Differently Regulates the JAK-STAT Signaling Pathway under Interleukin-6 and Interferon- γ Stimuli. *J. Biol. Chem.* 278, 28562–28571.
- Hsu, Y.-C., Lin, J.-T., Ho, H.J., Kao, Y.-H., Huang, Y.-T., Hsiao, N.-W., Wu, M.-S., Liu, Y.-Y., and Wu, C.-Y. (2014). Antiviral treatment for hepatitis C virus infection is associated with improved renal and cardiovascular outcomes in diabetic patients. *Hepatology* 59, 1293–1302.
- Hu, J., and Liu, K. (2017). Complete and Incomplete Hepatitis B Virus Particles: Formation, Function, and Application. *Viruses* 9, 56.
- Hu, J., Roy, S.K., Shapiro, P.S., Rodig, S.R., Reddy, S.P.M., Platanius, L.C., Schreiber, R.D., and Kalvakolanu, D.V. (2001). ERK1 and ERK2 Activate CCAAAT/Enhancer-binding Protein- β -dependent Gene Transcription in Response to Interferon- γ . *J. Biol. Chem.* 276, 287–297.
- Hu, J., Meng, Q., Roy, S.K., Raha, A., Hu, J., Zhang, J., Hashimoto, K., and Kalvakolanu, D.V. (2002). A novel transactivating factor that regulates interferon-gamma-dependent gene expression. *J. Biol. Chem.* 277, 30253–30263.
- Hu, J., Cheng, J., Tang, L., Hu, Z., Luo, Y., Li, Y., Zhou, T., Chang, J., and Guo, J.-T. (2019a). Virological Basis for the Cure of Chronic Hepatitis B. *ACS Infect. Dis.* 5, 659–674.
- Hu, Y., Liu, J.-P., Li, X.-Y., Cai, Y., He, C., Li, N.-S., Xie, C., Xiong, Z.-J., Ge, Z.-M., Lu, N.-H., et al. (2019b). Downregulation of tumor suppressor RACK1 by *Helicobacter pylori* infection promotes gastric carcinogenesis through the integrin β -1/NF- κ B signaling pathway. *Cancer Letters* 450, 144–154.
- Hu, Z., Zhang, Z., Doo, E., Coux, O., Goldberg, A.L., and Liang, T.J. (1999). Hepatitis B

- Virus X Protein Is both a Substrate and a Potential Inhibitor of the Proteasome Complex. *J Virol* *73*, 7231–7240.
- Huang, H., Sun, F., Owen, D.M., Li, W., Chen, Y., Gale, M., and Ye, J. (2007). Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 5848–5853.
 - Huang, H.-C., Chen, C.-C., Chang, W.-C., Tao, M.-H., and Huang, C. (2012). Entry of hepatitis B virus into immortalized human primary hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. *J. Virol.* *86*, 9443–9453.
 - Huang, J., Kwong, J., Sun, E.C., and Liang, T.J. (1996). Proteasome complex as a potential cellular target of hepatitis B virus X protein. *J Virol* *70*, 5582–5591.
 - Huang, L., Hwang, J., Sharma, S.D., Hargittai, M.R.S., Chen, Y., Arnold, J.J., Raney, K.D., and Cameron, C.E. (2005). Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A (NS5A) Is an RNA-binding Protein. *J. Biol. Chem.* *280*, 36417–36428.
 - Huang, Y., Zhang, Y., Ge, L., Lin, Y., and Kwok, H.F. (2018). The Roles of Protein Tyrosine Phosphatases in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers* *10*, 82.
 - Huang, Y.-W., Lin, S.-C., Wei, S.-C., Hu, J.-T., Chang, H.-Y., Huang, S.-H., Chen, D.-S., Chen, P.-J., Hsu, P.-N., Yang, S.-S., et al. (2013). Reduced Toll-like receptor 3 expression in chronic hepatitis B patients and its restoration by interferon therapy. *Antivir. Ther. (Lond.)* *18*, 877–884.
 - Hughes, S.A., Wedemeyer, H., and Harrison, P.M. (2011). Hepatitis delta virus. *Lancet* *378*, 73–85.
 - Huovila, A.P., Eder, A.M., and Fuller, S.D. (1992). Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment. *J. Cell Biol.* *118*, 1305–1320.
 - Hüttelmaier, S., Zenklusen, D., Lederer, M., Dichtenberg, J., Lorenz, M., Meng, X., Bassell, G.J., Condeelis, J., and Singer, R.H. (2005). Spatial regulation of β -actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* *438*, 512–515.
 - Ichai, P., and Samuel, D. (2019). Management of Fulminant Hepatitis B. *Curr Infect Dis Rep* *21*.
 - INSERM Hépatite C.
 - INSERM Hépatite B.
 - Irie-Sasaki, J., Sasaki, T., Matsumoto, W., Opavsky, A., Cheng, M., Welstead, G., Griffiths, E., Krawczyk, C., Richardson, C.D., Aitken, K., et al. (2001). CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature* *409*, 349–354.
 - Ishikawa, H., and Barber, G.N. (2008). STING is an endoplasmic reticulum adaptor that

- facilitates innate immune signalling. *Nature* 455, 674–678.
- Ito, T., Tahara, S.M., and Lai, M.M. (1998). The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site. *J. Virol.* 72, 8789–8796.
 - Ivanov, A.V., Smirnova, O.A., Petrushanko, I.Y., Ivanova, O.N., Karpenko, I.L., Alekseeva, E., Sominskaya, I., Makarov, A.A., Bartosch, B., Kochetkov, S.N., et al. (2015). HCV Core Protein Uses Multiple Mechanisms to Induce Oxidative Stress in Human Hepatoma Huh7 Cells. *Viruses* 7, 2745–2770.
 - Ivashkiv, L.B., and Donlin, L.T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews Immunology* 14, 36–49.
 - Iwamoto, M., Watashi, K., Tsukuda, S., Aly, H.H., Fukasawa, M., Fujimoto, A., Suzuki, R., Aizaki, H., Ito, T., Koiwai, O., et al. (2014). Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 443, 808–813.
 - Jackson, D., Tabor, E., and Gerety, R.J. (1979). Acute non-A, non-B hepatitis: specific ultrastructural alterations in endoplasmic reticulum of infected hepatocytes. *The Lancet* 313, 1249–1250.
 - Jackson, R.J., Hellen, C.U.T., and Pestova, T.V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, 113–127.
 - Jagya, N., Varma, S.P.K., Thakral, D., Joshi, P., Durgapal, H., and Panda, S.K. (2014). RNA-Seq Based Transcriptome Analysis of Hepatitis E Virus (HEV) and Hepatitis B Virus (HBV) Replicon Transfected Huh-7 Cells. *PLoS One* 9.
 - Janeway, C.A., and Medzhitov, R. (2002). Innate Immune Recognition. *Annual Review of Immunology* 20, 197–216.
 - Jee, M.H., Hong, K.Y., Park, J.H., Lee, J.S., Kim, H.S., Lee, S.H., and Jang, S.K. (2015). New Mechanism of Hepatic Fibrogenesis: Hepatitis C Virus Infection Induces Transforming Growth Factor β 1 Production through Glucose-Regulated Protein 94. *J. Virol.* 90, 3044–3055.
 - Jiang, J., and Luo, G. (2009). Apolipoprotein E but not B is required for the formation of infectious hepatitis C virus particles. *J. Virol.* 83, 12680–12691.
 - Jiang, J., Cun, W., Wu, X., Shi, Q., Tang, H., and Luo, G. (2012a). Hepatitis C Virus Attachment Mediated by Apolipoprotein E Binding to Cell Surface Heparan Sulfate. *J Virol* 86, 7256–7267.
 - Jiang, X., Kinch, L.N., Brautigam, C.A., Chen, X., Du, F., Grishin, N.V., and Chen, Z.J.

- (2012b). Ubiquitin-Induced Oligomerization of the RNA Sensors RIG-I and MDA5 Activates Antiviral Innate Immune Response. *Immunity* 36, 959–973.
- Jinushi, M., Takehara, T., Kanto, T., Tatsumi, T., Groh, V., Spies, T., Miyagi, T., Suzuki, T., Sasaki, Y., and Hayashi, N. (2003). Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN- α -stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J. Immunol.* 170, 1249–1256.
 - Jirasko, V., Montserret, R., Lee, J.Y., Gouttenoire, J., Moradpour, D., Penin, F., and Bartenschlager, R. (2010). Structural and functional studies of nonstructural protein 2 of the hepatitis C virus reveal its key role as organizer of virion assembly. *PLoS Pathog.* 6, e1001233.
 - John, J., McKendry, R., Pellegrini, S., Flavell, D., Kerr, I.M., and Stark, G.R. (1991). Isolation and characterization of a new mutant human cell line unresponsive to alpha and beta interferons. *Molecular and Cellular Biology* 11, 4189–4195.
 - Johnson, A.G., Lapointe, C.P., Wang, J., Corsepilus, N.C., Choi, J., Fuchs, G., and Puglisi, J.D. (2019). RACK1 on and off the ribosome. *RNA* 25, 881–895.
 - Jopling, C.L., Yi, M., Lancaster, A.M., Lemon, S.M., and Sarnow, P. (2005). Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 309, 1577–1581.
 - Jopling, C.L., Schütz, S., and Sarnow, P. (2008). Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell Host Microbe* 4, 77–85.
 - Junker-Niepmann, M., Bartenschlager, R., and Schaller, H. (1990). A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *EMBO J* 9, 3389–3396.
 - Kamizono, S., Hanada, T., Yasukawa, H., Minoguchi, S., Kato, R., Minoguchi, M., Hattori, K., Hatakeyama, S., Yada, M., Morita, S., et al. (2001). The SOCS Box of SOCS-1 Accelerates Ubiquitin-dependent Proteolysis of TEL-JAK2. *J. Biol. Chem.* 276, 12530–12538.
 - Kaneko, M., Watashi, K., Kamisuki, S., Matsunaga, H., Iwamoto, M., Kawai, F., Ohashi, H., Tsukuda, S., Shimura, S., Suzuki, R., et al. (2015). A Novel Tricyclic Polyketide, Vanitaracin A, Specifically Inhibits the Entry of Hepatitis B and D Viruses by Targeting Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide. *Journal of Virology* 89, 11945–11953.
 - Kaneko, T., Tanji, Y., Satoh, S., Hijikata, M., Asabe, S., Kimura, K., and Shimotohno, K. (1994). Production of Two Phosphoproteins from the NS5A Region of the Hepatitis C Viral

Bibliographie

- Genome. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 205, 320–326.
- Kao, J.-H., and Chen, D.-S. (2006). HBV genotypes: Epidemiology and implications regarding natural history. *Curr Hepatitis Rep* 5, 5–13.
 - Kaplan, D.E. (2015). Immunopathogenesis of Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterology Clinics* 44, 735–760.
 - Kaplan, P.M., Greenman, R.L., Gerin, J.L., Purcell, R.H., and Robinson, W.S. (1973). DNA Polymerase Associated with Human Hepatitis B Antigen. *J Virol* 12, 995–1005.
 - Kapoor, A., Simmonds, P., Gerold, G., Qaisar, N., Jain, K., Henriquez, J.A., Firth, C., Hirschberg, D.L., Rice, C.M., Shields, S., et al. (2011). Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 11608–11613.
 - Kared, H., Fabre, T., Bédard, N., Bruneau, J., and Shoukry, N.H. (2013). Galectin-9 and IL-21 Mediate Cross-regulation between Th17 and Treg Cells during Acute Hepatitis C. *PLoS Pathog* 9.
 - Karlas, A., Machuy, N., Shin, Y., Pleissner, K.-P., Artarini, A., Heuer, D., Becker, D., Khalil, H., Ogilvie, L.A., Hess, S., et al. (2010). Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature* 463, 818–822.
 - Kato, N., Yoshida, H., Ono-Nita, S.K., Kato, J., Goto, T., Otsuka, M., Lan, K., Matsushima, K., Shiratori, Y., and Omata, M. (2000). Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 32, 405–412.
 - Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Tokushige, K., Mizokami, M., and Wakita, T. (2003). Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* 125, 1808–1817.
 - Kattenhorn, L.M., Tipper, C.H., Stoica, L., Geraghty, D.S., Wright, T.L., Clark, K.R., and Wadsworth, S.C. (2016). Adeno-Associated Virus Gene Therapy for Liver Disease. *Hum Gene Ther* 27, 947–961.
 - Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K.J., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005). IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nature Immunology* 6, 981–988.
 - Kay, A., and Zoulim, F. (2007). Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Res.* 127, 164–176.
 - Kazmi, S.S., Ali, W., Bibi, N., and Nouroz, F. (2020). A review on Zika virus outbreak, epidemiology, transmission and infection dynamics. *J Biol Res (Thessalon)* 27.
 - Keck, M.-L., Wensch, F., Pierce, B.G., Baumert, T.F., and Fong, S.K.H. (2018). Mapping Determinants of Virus Neutralization and Viral Escape for Rational Design of a Hepatitis

- C Virus Vaccine. *Front Immunol* 9, 1194.
- Khawaja, A., Vopalensky, V., and Pospisek, M. (2015). Understanding the potential of hepatitis C virus internal ribosome entry site domains to modulate translation initiation via their structure and function. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 6, 211–224.
 - Kidd-Ljunggren, K., Miyakawa, Y., and Kidd, A.H. (2002). Genetic variability in hepatitis B viruses. *J. Gen. Virol.* 83, 1267–1280.
 - Kieft, J.S., Zhou, K., Jubin, R., and Doudna, J.A. (2001). Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA. *RNA* 7, 194–206.
 - Kim, T.K., and Maniatis, T. (1997). The mechanism of transcriptional synergy of an in vitro assembled interferon-beta enhanceosome. *Mol. Cell* 1, 119–129.
 - Kim, D.-H., Ni, Y., Lee, S.-H., Urban, S., and Han, K.-H. (2008a). An anti-viral peptide derived from the preS1 surface protein of hepatitis B virus. *BMB Rep* 41, 640–644.
 - Kim, H., Bose, S.K., Meyer, K., and Ray, R. (2014). Hepatitis C Virus Impairs Natural Killer Cell-Mediated Augmentation of Complement Synthesis. *Journal of Virology* 88, 2564–2571.
 - Kim, H.D., Kong, E., Kim, Y., Chang, J.-S., and Kim, J. (2017). RACK1 depletion in the ribosome induces selective translation for non-canonical autophagy. *Cell Death & Disease* 8, e2800–e2800.
 - Kim, J.H., Paek, K.Y., Ha, S.H., Cho, S., Choi, K., Kim, C.S., Ryu, S.H., and Jang, S.K. (2004). A Cellular RNA-Binding Protein Enhances Internal Ribosomal Entry Site-Dependent Translation through an Interaction Downstream of the Hepatitis C Virus Polyprotein Initiation Codon. *Molecular and Cellular Biology* 24, 7878–7890.
 - Kim, J.H., Park, S.M., Park, J.H., Keum, S.J., and Jang, S.K. (2011). eIF2A mediates translation of hepatitis C viral mRNA under stress conditions. *EMBO J.* 30, 2454–2464.
 - Kim, J.-Y., Beg, A.A., and Haura, E.B. (2013). Non-canonical IKKs, IKK ϵ and TBK1, as novel therapeutic targets in the treatment of non-small cell lung cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* 17, 1109–1112.
 - Kim, S., Park, S.-Y., Yong, H., Famulski, J.K., Chae, S., Lee, J.-H., Kang, C.-M., Saya, H., Chan, G.K., and Cho, H. (2008b). HBV X protein targets hBubR1, which induces dysregulation of the mitotic checkpoint. *Oncogene* 27, 3457–3464.
 - Kimura, T., Kadokawa, Y., Harada, H., Matsumoto, M., Sato, M., Kashiwazaki, Y., Tarutani, M., Tan, R.S.-P., Takasugi, T., Matsuyama, T., et al. (1996). Essential and non-redundant roles of p48 (ISGF3 γ) and IRF-1 in both type I and type II interferon responses, as revealed by gene targeting studies. *Genes to Cells* 1, 115–124.

Bibliographie

- Kinchen, V.J., Cox, A.L., and Bailey, J.R. (2018). Can Broadly Neutralizing Monoclonal Antibodies Lead to a Hepatitis C Virus Vaccine? *Trends in Microbiology* 26, 854–864.
- Kiser, J.J., Burton, J.R., Anderson, P.L., and Everson, G.T. (2012). Review and management of drug interactions with boceprevir and telaprevir. *Hepatology* 55, 1620–1628.
- Kish, T., Aziz, A., and Sorio, M. (2017). Hepatitis C in a New Era: A Review of Current Therapies. *P T* 42, 316–329.
- Kitamura, K., Que, L., Shimadu, M., Koura, M., Ishihara, Y., Wakae, K., Nakamura, T., Watashi, K., Wakita, T., and Muramatsu, M. (2018). Flap endonuclease 1 is involved in cccDNA formation in the hepatitis B virus. *PLoS Pathog.* 14, e1007124.
- Klampfer, L., Huang, J., Swaby, L.-A., and Augenlicht, L. (2004). Requirement of Histone Deacetylase Activity for Signaling by STAT1. *J. Biol. Chem.* 279, 30358–30368.
- Knoll, S., Fürst, K., Thomas, S., Villanueva Baselga, S., Stoll, A., Schaefer, S., and Pützer, B.M. (2011). Dissection of cell context-dependent interactions between HBx and p53 family members in regulation of apoptosis: a role for HBV-induced HCC. *Cell Cycle* 10, 3554–3565.
- Koh, C., Surana, P., Han, T., Fryzek, N., Kapuria, D., Etzion, O., Takyar, V., Rotman, Y., Canales, R., Dahari, H., et al. (2017). A phase 2 study exploring once daily dosing of ritonavir boosted lonafarnib for the treatment of chronic delta hepatitis – end of study results from the LOWR HDV-3 study. *Journal of Hepatology* 66, S101–S102.
- Koh, C., Da, B.L., Surana, P., Huang, A., Kapuria, D., Rotman, Y., Vittal, A., Gilman, C., Ben-Yakov, G., Lai, C., et al. (2019). A phase 2 study of lonafarnib, ritonavir and peginterferon lambda for 24 weeks: interim end-of-treatment results from the LIFT HDV study. *Hepatology* 70, S101–S102.
- Kohlway, A., Pirakitikulr, N., Barrera, F.N., Potapova, O., Engelman, D.M., Pyle, A.M., and Lindenbach, B.D. (2014). Hepatitis C virus RNA replication and virus particle assembly require specific dimerization of the NS4A protein transmembrane domain. *J. Virol.* 88, 628–642.
- Kolupaeva, V.G., Pestova, T.V., and Hellen, C.U. (2000). An enzymatic footprinting analysis of the interaction of 40S ribosomal subunits with the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *J. Virol.* 74, 6242–6250.
- Kong, L.K., and Sarnow, P. (2002). Cytoplasmic expression of mRNAs containing the internal ribosome entry site and 3' noncoding region of hepatitis C virus: effects of the 3' leader on mRNA translation and mRNA stability. *J. Virol.* 76, 12457–12462.

Bibliographie

- Kong, L., Fujimoto, A., Nakamura, M., Aoyagi, H., Matsuda, M., Watashi, K., Suzuki, R., Arita, M., Yamagoe, S., Dohmae, N., et al. (2016). Prolactin Regulatory Element Binding Protein Is Involved in Hepatitis C Virus Replication by Interaction with NS4B. *J. Virol.* *90*, 3093–3111.
- König, R., Zhou, Y., Elleder, D., Diamond, T.L., Bonamy, G.M.C., Irelan, J.T., Chiang, C.-Y., Tu, B.P., De Jesus, P.D., Lilley, C.E., et al. (2008). Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell* *135*, 49–60.
- König, R., Stertz, S., Zhou, Y., Inoue, A., Hoffmann, H.-H., Bhattacharyya, S., Alamares, J.G., Tscherne, D.M., Ortigoza, M.B., Liang, Y., et al. (2010). Human host factors required for influenza virus replication. *Nature* *463*, 813–817.
- Königer, C., Wingert, I., Marsmann, M., Rösler, C., Beck, J., and Nassal, M. (2014). Involvement of the host DNA-repair enzyme TDP2 in formation of the covalently closed circular DNA persistence reservoir of hepatitis B viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *111*, E4244-4253.
- Korenaga, M., Wang, T., Li, Y., Showalter, L.A., Chan, T., Sun, J., and Weinman, S.A. (2005). Hepatitis C Virus Core Protein Inhibits Mitochondrial Electron Transport and Increases Reactive Oxygen Species (ROS) Production. *J. Biol. Chem.* *280*, 37481–37488.
- Kou, L., Yao, Q., Sun, M., Wu, C., Wang, J., Luo, Q., Wang, G., Du, Y., Fu, Q., Wang, J., et al. (2017). Cotransporting Ion is a Trigger for Cellular Endocytosis of Transporter-Targeting Nanoparticles: A Case Study of High-Efficiency SLC22A5 (OCTN2)-Mediated Carnitine-Conjugated Nanoparticles for Oral Delivery of Therapeutic Drugs. *Advanced Healthcare Materials* *6*, 1700165.
- Kowalinski, E., Lunardi, T., McCarthy, A.A., Louber, J., Brunel, J., Grigorov, B., Gerlier, D., and Cusack, S. (2011). Structural Basis for the Activation of Innate Immune Pattern-Recognition Receptor RIG-I by Viral RNA. *Cell* *147*, 423–435.
- Krieger, S.E., Zeisel, M.B., Davis, C., Thumann, C., Harris, H.J., Schnober, E.K., Mee, C., Soulier, E., Royer, C., Lambotin, M., et al. (2010). Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-claudin-1 associations. *Hepatology* *51*, 1144–1157.
- Krijnse-Locker, J., Ericsson, M., Rottier, P.J., and Griffiths, G. (1994). Characterization of the budding compartment of mouse hepatitis virus: evidence that transport from the RER to the Golgi complex requires only one vesicular transport step. *J. Cell Biol.* *124*, 55–70.
- Krueger, P.D., Lassen, M.G., Qiao, H., and Hahn, Y.S. (2011). Regulation of NK Cell Repertoire and Function in the Liver. *CRI* *31*.

Bibliographie

- Kuo, G., Choo, Q.L., Alter, H.J., Gitnick, G.L., Redeker, A.G., Purcell, R.H., Miyamura, T., Dienstag, J.L., Alter, M.J., and Stevens, C.E. (1989). An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 244, 362–364.
- Kuo, Y.-C., Chen, I.-Y., Chang, S.C., Wu, S.-C., Hung, T.-M., Lee, P.-H., Shimotohno, K., and Chang, M.-F. (2014). Hepatitis C virus NS5A protein enhances gluconeogenesis through upregulation of Akt-/JNK-PEPCK signalling pathways. *Liver Int.* 34, 1358–1368.
- Labeau, A., Simon-Lorieri, E., Hafirassou, M.-L., Bonnet-Madin, L., Tessier, S., Zamborlini, A., Dupré, T., Seta, N., Schwartz, O., Chaix, M.-L., et al. (2020). A Genome-Wide CRISPR-Cas9 Screen Identifies the Dolichol-Phosphate Mannose Synthase Complex as a Host Dependency Factor for Dengue Virus Infection. *J. Virol.* 94.
- Ladner, S.K., Otto, M.J., Barker, C.S., Zaifert, K., Wang, G.H., Guo, J.T., Seeger, C., and King, R.W. (1997). Inducible expression of human hepatitis B virus (HBV) in stably transfected hepatoblastoma cells: a novel system for screening potential inhibitors of HBV replication. *Antimicrob Agents Chemother* 41, 1715–1720.
- LaFontaine, E., Miller, C.M., Permaul, N., Martin, E.T., and Fuchs, G. (2020). Ribosomal protein RACK1 enhances translation of poliovirus and other viral IRESs. *Virology* 545, 53–62.
- Lambert, C., and Prange, R. (2003). Chaperone action in the posttranslational topological reorientation of the hepatitis B virus large envelope protein: Implications for translocational regulation. *PNAS* 100, 5199–5204.
- Lambert, S.M., Langley, D.R., Garnett, J.A., Angell, R., Hedgethorpe, K., Meanwell, N.A., and Matthews, S.J. (2014). The crystal structure of NS5A domain 1 from genotype 1a reveals new clues to the mechanism of action for dimeric HCV inhibitors. *Protein Sci.* 23, 723–734.
- Lamontagne, J., Mell, J.C., and Bouchard, M.J. (2016). Transcriptome-Wide Analysis of Hepatitis B Virus-Mediated Changes to Normal Hepatocyte Gene Expression. *PLOS Pathogens* 12, e1005438.
- Landers, T.A., Greenberg, H.B., and Robinson, W.S. (1977). Structure of hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction. *J. Virol.* 23, 368–376.
- Laras, A., Koskinas, J., Avgidis, K., and Hadziyannis, S.J. (1998). Incidence and clinical significance of hepatitis B virus precore gene translation initiation mutations in e antigen-negative patients. *J. Viral Hepat.* 5, 241–248.
- Lau, C.-C., Sun, T., Ching, A.K.K., He, M., Li, J.-W., Wong, A.M., Co, N.N., Chan,

Bibliographie

- A.W.H., Li, P.-S., Lung, R.W.M., et al. (2014). Viral-Human Chimeric Transcript Predisposes Risk to Liver Cancer Development and Progression. *Cancer Cell* 25, 335–349.
- Lau, G.K.K., Piratvisuth, T., Luo, K.X., Marcellin, P., Thongsawat, S., Cooksley, G., Gane, E., Fried, M.W., Chow, W.C., Paik, S.W., et al. (2005). Peginterferon Alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.* 352, 2682–2695.
 - Lavillette, D., Morice, Y., Germanidis, G., Donot, P., Soulier, A., Pagkalos, E., Sakellariou, G., Intrator, L., Bartosch, B., Pawlotsky, J.-M., et al. (2005). Human Serum Facilitates Hepatitis C Virus Infection, and Neutralizing Responses Inversely Correlate with Viral Replication Kinetics at the Acute Phase of Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Virology* 79, 6023–6034.
 - Lechner, F., Gruener, N.H., Urbani, S., Uggeri, J., Santantonio, T., Kammer, A.R., Cerny, A., Phillips, R., Ferrari, C., Pape, G.R., et al. (2000). CD8+ T lymphocyte responses are induced during acute hepatitis C virus infection but are not sustained. *European Journal of Immunology* 30, 2479–2487.
 - Lee, W.M. (1993). Acute liver failure. *N. Engl. J. Med.* 329, 1862–1872.
 - Lee, H., Shin, H., Wimmer, E., and Paul, A.V. (2004a). cis-acting RNA signals in the NS5B C-terminal coding sequence of the hepatitis C virus genome. *J. Virol.* 78, 10865–10877.
 - Lee, J., Tian, Y., Chan, S.T., Kim, J.Y., Cho, C., and Ou, J.J. (2015). TNF- α Induced by Hepatitis C Virus via TLR7 and TLR8 in Hepatocytes Supports Interferon Signaling via an Autocrine Mechanism. *PLoS Pathog* 11.
 - Lee, J.S., Tabata, K., Twu, W.-I., Rahman, M.S., Kim, H.S., Yu, J.B., Jee, M.H., Bartenschlager, R., and Jang, S.K. (2019a). RACK1 mediates rewiring of intracellular networks induced by hepatitis C virus infection. *PLoS Pathog.* 15, e1008021.
 - Lee, J.-Y., Cortese, M., Haselmann, U., Tabata, K., Romero-Brey, I., Funaya, C., Schieber, N.L., Qiang, Y., Bartenschlager, M., Kallis, S., et al. (2019b). Spatiotemporal Coupling of the Hepatitis C Virus Replication Cycle by Creating a Lipid Droplet- Proximal Membranous Replication Compartment. *Cell Reports* 27, 3602-3617.e5.
 - Lee, K.J., Choi, J., Ou, J., and Lai, M.M.C. (2004b). The C-Terminal Transmembrane Domain of Hepatitis C Virus (HCV) RNA Polymerase Is Essential for HCV Replication In Vivo. *J Virol* 78, 3797–3802.
 - Levrero, M., Pollicino, T., Petersen, J., Belloni, L., Raimondo, G., and Dandri, M. (2009). Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 51, 581–592.
 - Levy, D. e., Lew, D. j., Decker, T., Kessler, D. s., and Darnell Jr, J. e. (1990). Synergistic

- interaction between interferon-alpha and interferon-gamma through induced synthesis of one subunit of the transcription factor ISGF3. *The EMBO Journal* *9*, 1105–1111.
- Li, G., and De Clercq, E. (2017). Current therapy for chronic hepatitis C: The role of direct-acting antivirals. *Antiviral Res.* *142*, 83–122.
 - Li, J.-J., and Xie, D. (2015). RACK1, a versatile hub in cancer. *Oncogene* *34*, 1890–1898.
 - Li, B., Clohisey, S.M., Chia, B.S., Wang, B., Cui, A., Eisenhaure, T., Schweitzer, L.D., Hoover, P., Parkinson, N.J., Nachshon, A., et al. (2020). Genome-wide CRISPR screen identifies host dependency factors for influenza A virus infection. *Nature Communications* *11*, 1–18.
 - Li, H., Huang, M.-H., Jiang, J.-D., and Peng, Z.-G. (2018). Hepatitis C: From inflammatory pathogenesis to anti-inflammatory/hepatoprotective therapy. *World Journal of Gastroenterology* *24*, 5297–5311.
 - Li, H.-C., Huang, E.-Y., Su, P.-Y., Wu, S.-Y., Yang, C.-C., Lin, Y.-S., Chang, W.-C., and Shih, C. (2010). Nuclear Export and Import of Human Hepatitis B Virus Capsid Protein and Particles. *PLoS Pathog* *6*.
 - Li, K., Foy, E., Ferreon, J.C., Nakamura, M., Ferreon, A.C.M., Ikeda, M., Ray, S.C., Gale, M., and Lemon, S.M. (2005a). Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *PNAS* *102*, 2992–2997.
 - Li, K., Li, N.L., Wei, D., Pfeffer, S.R., Fan, M., and Pfeffer, L.M. (2012a). Activation of chemokine and inflammatory cytokine response in hepatitis C virus–infected hepatocytes depends on toll-like receptor 3 sensing of hepatitis C virus double-stranded RNA intermediates. *Hepatology* *55*, 666–675.
 - Li, Q., Zhang, Y.-Y., Chiu, S., Hu, Z., Lan, K.-H., Cha, H., Sodroski, C., Zhang, F., Hsu, C.-S., Thomas, E., et al. (2014). Integrative Functional Genomics of Hepatitis C Virus Infection Identifies Host Dependencies in Complete Viral Replication Cycle. *PLOS Pathogens* *10*, e1004163.
 - Li, S., Yu, X., Guo, Y., and Kong, L. (2012b). Interaction networks of hepatitis C virus NS4B: implications for antiviral therapy. *Cell. Microbiol.* *14*, 994–1002.
 - Li, X.-D., Sun, L., Seth, R.B., Pineda, G., and Chen, Z.J. (2005b). Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 17717–17722.
 - Li, Y., Sassano, A., Majchrzak, B., Deb, D.K., Levy, D.E., Gaestel, M., Nebreda, A.R., Fish, E.N., and Plataniias, L.C. (2004). Role of p38 α Map Kinase in Type I Interferon Signaling. *J. Biol. Chem.* *279*, 970–979.

Bibliographie

- Li, Y., Batra, S., Sassano, A., Majchrzak, B., Levy, D.E., Gaestel, M., Fish, E.N., Davis, R.J., and Plataniias, L.C. (2005c). Activation of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase (MKK) 3 and MKK6 by Type I Interferons. *J. Biol. Chem.* *280*, 10001–10010.
- Li Xiang, Li Jinqun, Qian Jinhong, Zhang Dongping, Shen Haitao, Li Xiang, Li Haiying, and Chen Gang (2019). Loss of Ribosomal RACK1 (Receptor for Activated Protein Kinase C 1) Induced by Phosphorylation at T50 Alleviates Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Stroke* *50*, 162–171.
- Liang, H.-W., Wang, N., Wang, Y., Wang, F., Fu, Z., Yan, X., Zhu, H., Diao, W., Ding, Y., Chen, X., et al. (2016). Hepatitis B virus-human chimeric transcript HBx-LINE1 promotes hepatic injury via sequestering cellular microRNA-122. *Journal of Hepatology* *64*, 278–291.
- Liang, Y., Cao, X., Ding, Q., Zhao, Y., He, Z., and Zhong, J. (2018). Hepatitis C virus NS4B induces the degradation of TRIF to inhibit TLR3-mediated interferon signaling pathway. *PLOS Pathogens* *14*, e1007075.
- Liao, N.P.D., Laktyushin, A., Lucet, I.S., Murphy, J.M., Yao, S., Whitlock, E., Callaghan, K., Nicola, N.A., Kershaw, N.J., and Babon, J.J. (2018). The molecular basis of JAK/STAT inhibition by SOCS1. *Nature Communications* *9*, 1–14.
- Lin, D.L., Cherepanova, N.A., Bozzacco, L., MacDonald, M.R., Gilmore, R., and Tai, A.W. (2017). Dengue Virus Hijacks a Noncanonical Oxidoreductase Function of a Cellular Oligosaccharyltransferase Complex. *MBio* *8*.
- Lin, S.-M., Yu, M.-L., Lee, C.-M., Chien, R.-N., Sheen, I.-S., Chu, C.-M., and Liaw, Y.-F. (2007). Interferon therapy in HBeAg positive chronic hepatitis reduces progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* *46*, 45–52.
- Lin, W., Choe, W.H., Hiasa, Y., Kamegaya, Y., Blackard, J.T., Schmidt, E.V., and Chung, R.T. (2005). Hepatitis C virus expression suppresses interferon signaling by degrading STAT1. *Gastroenterology* *128*, 1034–1041.
- Lin, W., Kim, S.S., Yeung, E., Kamegaya, Y., Blackard, J.T., Kim, K.A., Holtzman, M.J., and Chung, R.T. (2006). Hepatitis C Virus Core Protein Blocks Interferon Signaling by Interaction with the STAT1 SH2 Domain. *Journal of Virology* *80*, 9226–9235.
- Lindenbach, B.D., and Rice, C.M. (1999). Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J. Virol.* *73*, 4611–4621.
- Lindenbach, B.D., Prágai, B.M., Montserret, R., Beran, R.K.F., Pyle, A.M., Penin, F., and Rice, C.M. (2007). The C terminus of hepatitis C virus NS4A encodes an electrostatic switch that regulates NS5A hyperphosphorylation and viral replication. *J. Virol.* *81*, 8905–

8918.

- Litvak, V., Ratushny, A.V., Lampano, A.E., Schmitz, F., Huang, A.C., Raman, A., Rust, A.G., Bergthaler, A., Aitchison, J.D., and Aderem, A. (2012). A FOXO3–IRF7 gene regulatory circuit limits inflammatory sequelae of antiviral responses. *Nature* 490, 421–425.
- Liu, D., Liu, X., Zhou, T., Yao, W., Zhao, J., Zheng, Z., Jiang, W., Wang, F., Aikhionbare, F.O., Hill, D.L., et al. (2016). IRE1–RACK1 axis orchestrates ER stress preconditioning-elicited cytoprotection from ischemia/reperfusion injury in liver. *J Mol Cell Biol* 8, 144–156.
- Liu, S., Yang, W., Shen, L., Turner, J.R., Coyne, C.B., and Wang, T. (2009a). Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J. Virol.* 83, 2011–2014.
- Liu, S., Chen, J., Cai, X., Wu, J., Chen, X., Wu, Y.-T., Sun, L., and Chen, Z.J. (2013). MAVS recruits multiple ubiquitin E3 ligases to activate antiviral signaling cascades. *ELife* 2, e00785.
- Liu, Y., Nonnemacher, M.R., and Wigdahl, B. (2009b). CCAAT/enhancer-binding proteins and the pathogenesis of retrovirus infection. *Future Microbiol* 4, 299–321.
- Liu, Y., Wang, W., Zou, Z., Hu, Z., Fan, Q., and Xiong, J. (2019). Hepatitis C Virus Entry into Macrophages/Monocytes Mainly Depends on the Phagocytosis of Macrophages. *Dig. Dis. Sci.* 64, 1226–1237.
- Locker, N., Easton, L.E., and Lukavsky, P.J. (2007). HCV and CSFV IRES domain II mediate eIF2 release during 80S ribosome assembly. *The EMBO Journal* 26, 795–805.
- Loeb, D.D., Hirsch, R.C., and Ganem, D. (1991). Sequence-independent RNA cleavages generate the primers for plus strand DNA synthesis in hepatitis B viruses: implications for other reverse transcribing elements. *EMBO J.* 10, 3533–3540.
- Logvinoff, C., Major, M.E., Oldach, D., Heyward, S., Talal, A., Balfe, P., Feinstone, S.M., Alter, H., Rice, C.M., and McKeating, J.A. (2004). Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *PNAS* 101, 10149–10154.
- Lohmann, V., Körner, F., Herian, U., and Bartenschlager, R. (1997). Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J Virol* 71, 8416–8428.
- Lok, A.S., Zoulim, F., Dusheiko, G., and Ghany, M.G. (2017). Hepatitis B cure: From discovery to regulatory approval. *Journal of Hepatology* 67, 847–861.
- Long, L., Deng, Y., Yao, F., Guan, D., Feng, Y., Jiang, H., Li, X., Hu, P., Lu, X., Wang, H., et al. (2014). Recruitment of phosphatase PP2A by RACK1 adaptor protein deactivates

Bibliographie

- transcription factor IRF3 and limits type I interferon signaling. *Immunity* *40*, 515–529.
- Long, Q., Yan, R., Hu, J., Cai, D., Mitra, B., Kim, E.S., Marchetti, A., Zhang, H., Wang, S., Liu, Y., et al. (2017). The role of host DNA ligases in hepadnavirus covalently closed circular DNA formation. *PLoS Pathog.* *13*, e1006784.
 - Longo, N., Frigeni, M., and Pasquali, M. (2016). CARNITINE TRANSPORT AND FATTY ACID OXIDATION. *Biochim Biophys Acta* *1863*, 2422–2435.
 - Loo, Y.-M., Owen, D.M., Li, K., Erickson, A.K., Johnson, C.L., Fish, P.M., Carney, D.S., Wang, T., Ishida, H., Yoneyama, M., et al. (2006). Viral and therapeutic control of IFN- β promoter stimulator 1 during hepatitis C virus infection. *PNAS* *103*, 6001–6006.
 - López-Bergami, P., Habelhah, H., Bhoumik, A., Zhang, W., Wang, L.-H., and Ronai, Z. (2005). Receptor for RACK1 Mediates Activation of JNK by Protein Kinase C. *Molecular Cell* *19*, 309–320.
 - Lopez-Bergami, P., Huang, C., Goydos, J.S., Yip, D., Bar-Eli, M., Herlyn, M., Smalley, K.S.M., Mahale, A., Eroshkin, A., Aaronson, S., et al. (2007). Rewired ERK-JNK Signaling Pathways in Melanoma. *Cancer Cell* *11*, 447–460.
 - Lopez-Bergami, P., Lau, E., and Ronai, Z. (2010). Emerging roles of ATF2 and the dynamic AP1 network in cancer. *Nature Reviews Cancer* *10*, 65–76.
 - Love, R.A., Brodsky, O., Hickey, M.J., Wells, P.A., and Cronin, C.N. (2009). Crystal Structure of a Novel Dimeric Form of NS5A Domain I Protein from Hepatitis C Virus. *J Virol* *83*, 4395–4403.
 - Lu, X., Mehta, A., Dwek, R., Butters, T., and Block, T. (1995). Evidence that N-linked glycosylation is necessary for hepatitis B virus secretion. *Virology* *213*, 660–665.
 - de Lucas, S., Bartolomé, J., and Carreño, V. (2005). Hepatitis C Virus Core Protein Down-Regulates Transcription of Interferon-Induced Antiviral Genes. *J Infect Dis* *191*, 93–99.
 - Lucifora, J., Arzberger, S., Durantel, D., Belloni, L., Strubin, M., Levrero, M., Zoulim, F., Hantz, O., and Protzer, U. (2011). Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J. Hepatol.* *55*, 996–1003.
 - Lukavsky, P.J. (2009). Structure and function of HCV IRES domains. *Virus Res* *139*, 166–171.
 - Lundin, M., Lindström, H., Grönwall, C., and Persson, M.A.A. (2006). Dual topology of the processed hepatitis C virus protein NS4B is influenced by the NS5A protein. *J. Gen. Virol.* *87*, 3263–3272.
 - Lunemann, S., Malone, D.F.G., Grabowski, J., Port, K., Béziat, V., Bremer, B., Malmberg, K.-J., Manns, M.P., Sandberg, J.K., Cornberg, M., et al. (2015). Effects of HDV infection

- and pegylated interferon α treatment on the natural killer cell compartment in chronically infected individuals. *Gut* 64, 469–482.
- Luo, G., Hamatake, R.K., Mathis, D.M., Racela, J., Rigat, K.L., Lemm, J., and Colonno, R.J. (2000). De novo initiation of RNA synthesis by the RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) of hepatitis C virus. *J. Virol.* 74, 851–863.
 - Lupberger, J., Zeisel, M.B., Xiao, F., Thumann, C., Fofana, I., Zona, L., Davis, C., Mee, C.J., Turek, M., Gorke, S., et al. (2011). EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat. Med.* 17, 589–595.
 - Lupberger, J., Schaedler, S., Peiran, A., and Hildt, E. (2013). Identification and characterization of a novel bipartite nuclear localization signal in the hepatitis B virus polymerase. *World J. Gastroenterol.* 19, 8000–8010.
 - Lupberger, J., Casanova, C., Fischer, B., Weiss, A., Fofana, I., Fontaine, N., Fujiwara, T., Renaud, M., Kopp, A., Schuster, C., et al. (2015). PI4K-beta and MKNK1 are regulators of hepatitis C virus IRES-dependent translation. *Scientific Reports* 5, 1–5.
 - Luquin, E., Larrea, E., Civeira, M.P., Prieto, J., and Aldabe, R. (2007). HCV structural proteins interfere with interferon-alpha Jak/STAT signalling pathway. *Antiviral Research* 76, 194–197.
 - Maccallum, F.O. (1947). Homologous serum hepatitis. *The Lancet* 252, 477.
 - Machida, K., Cheng, K.T.H., Sung, V.M.-H., Levine, A.M., Fong, S., and Lai, M.M.C. (2006). Hepatitis C virus induces toll-like receptor 4 expression, leading to enhanced production of beta interferon and interleukin-6. *J. Virol.* 80, 866–874.
 - Mackenzie, J.M., and Westaway, E.G. (2001). Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. *J. Virol.* 75, 10787–10799.
 - Madan, V., Paul, D., Lohmann, V., and Bartenschlager, R. (2014). Inhibition of HCV replication by cyclophilin antagonists is linked to replication fitness and occurs by inhibition of membranous web formation. *Gastroenterology* 146, 1361-1372.e1-9.
 - Majoros, A., Platanitis, E., Kernbauer-Hölzl, E., Rosebrock, F., Müller, M., and Decker, T. (2017). Canonical and Non-Canonical Aspects of JAK–STAT Signaling: Lessons from Interferons for Cytokine Responses. *Front. Immunol.* 8.
 - Majzoub, K., Hafirassou, M.L., Meignin, C., Goto, A., Marzi, S., Fedorova, A., Verdier, Y., Vinh, J., Hoffmann, J.A., Martin, F., et al. (2014). RACK1 controls IRES-mediated translation of viruses. *Cell* 159, 1086–1095.
 - Malfertheiner, P., Megraud, F., O’Morain, C.A., Gisbert, J.P., Kuipers, E.J., Axon, A.T.,

- Bazzoli, F., Gasbarrini, A., Atherton, J., Graham, D.Y., et al. (2017). Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut* 66, 6–30.
- Mankouri, J., Walter, C., Stewart, H., Bentham, M., Park, W.S., Heo, W.D., Fukuda, M., Griffin, S., and Harris, M. (2016). Release of Infectious Hepatitis C Virus from Huh7 Cells Occurs via a trans-Golgi Network-to-Endosome Pathway Independent of Very-Low-Density Lipoprotein Secretion. *Journal of Virology* 90, 7159–7170.
 - Marceau, C.D., Puschnik, A.S., Majzoub, K., Ooi, Y.S., Brewer, S.M., Fuchs, G., Swaminathan, K., Mata, M.A., Elias, J.E., Sarnow, P., et al. (2016). Genetic dissection of Flaviviridae host factors through genome-scale CRISPR screens. *Nature* 535, 159–163.
 - Marcellin, P., Lau, G.K.K., Bonino, F., Farci, P., Hadziyannis, S., Jin, R., Lu, Z.-M., Piratvisuth, T., Germanidis, G., Yurdaydin, C., et al. (2004). Peginterferon alfa-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.* 351, 1206–1217.
 - Marcellin, P., Bonino, F., Lau, G.K.K., Farci, P., Yurdaydin, C., Piratvisuth, T., Jin, R., Gurel, S., Lu, Z.-M., Wu, J., et al. (2009). Sustained response of hepatitis B e antigen-negative patients 3 years after treatment with peginterferon alpha-2a. *Gastroenterology* 136, 2169-2179.e1-4.
 - Martin-Lluesma, S., Schaeffer, C., Robert, E.I., van Breugel, P.C., Leupin, O., Hantz, O., and Strubin, M. (2008). Hepatitis B virus X protein affects S phase progression leading to chromosome segregation defects by binding to damaged DNA binding protein 1. *Hepatology* 48, 1467–1476.
 - Martino, L., Pennell, S., Kelly, G., Bui, T.T.T., Kotik-Kogan, O., Smerdon, S.J., Drake, A.F., Curry, S., and Conte, M.R. (2012). Analysis of the interaction with the hepatitis C virus mRNA reveals an alternative mode of RNA recognition by the human La protein. *Nucleic Acids Res.* 40, 1381–1394.
 - Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. (2002). The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL- β . *Molecular Cell* 10, 417–426.
 - Masaki, T., Matsunaga, S., Takahashi, H., Nakashima, K., Kimura, Y., Ito, M., Matsuda, M., Murayama, A., Kato, T., Hirano, H., et al. (2014). Involvement of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation mediated by casein kinase I- α in infectious virus production. *J. Virol.* 88, 7541–7555.
 - Maupas, P., Goudeau, A., Coursaget, P., Drucker, J., and Bagros, P. (1976). Immunisation against hepatitis B in man. *Lancet* 1, 1367–1370.

Bibliographie

- McAllister, C.S., and Samuel, C.E. (2009). The RNA-activated Protein Kinase Enhances the Induction of Interferon- β and Apoptosis Mediated by Cytoplasmic RNA Sensors. *J. Biol. Chem.* *284*, 1644–1651.
- McMahon, B.J., Alward, W.L.M., Hall, D.B., Heyward, W.L., Bender, T.R., Francis, D.P., and Maynard, J.E. (1985). Acute Hepatitis B Virus Infection: Relation of Age to the Clinical Expression of Disease and Subsequent Development of the Carrier State. *J Infect Dis* *151*, 599–603.
- Medvedev, R., Ploen, D., and Hildt, E. (2016). HCV and Oxidative Stress: Implications for HCV Life Cycle and HCV-Associated Pathogenesis (Hindawi).
- Medzhitov, R., and Janeway, C.A. (1997). Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition. *Cell* *91*, 295–298.
- Meertens, L., Bertaux, C., and Dragic, T. (2006). Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *J. Virol.* *80*, 11571–11578.
- Mehle, A., and Doudna, J.A. (2010). A Host of Factors Regulating Influenza Virus Replication. *Viruses* *2*, 566–573.
- Mehta, A., Lu, X., Block, T.M., Blumberg, B.S., and Dwek, R.A. (1997). Hepatitis B virus (HBV) envelope glycoproteins vary drastically in their sensitivity to glycan processing: evidence that alteration of a single N-linked glycosylation site can regulate HBV secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 1822–1827.
- Meng, Q., and Xia, Y. (2011). c-Jun, at the crossroad of the signaling network. *Protein Cell* *2*, 889–898.
- Meng, Q., Raha, A., Roy, S., Hu, J., and Kalvakolanu, D.V. (2005). IFN-gamma-stimulated transcriptional activation by IFN-gamma-activated transcriptional element-binding factor 1 occurs via an inducible interaction with CAAAT/enhancer-binding protein-beta. *J. Immunol.* *174*, 6203–6211.
- Menzel, N., Fischl, W., Hueging, K., Bankwitz, D., Frentzen, A., Haid, S., Gentzsch, J., Kaderali, L., Bartenschlager, R., and Pietschmann, T. (2012). MAP-kinase regulated cytosolic phospholipase A2 activity is essential for production of infectious hepatitis C virus particles. *PLoS Pathog.* *8*, e1002829.
- Merika, M., Williams, A.J., Chen, G., Collins, T., and Thanos, D. (1998). Recruitment of CBP/p300 by the IFN beta enhanceosome is required for synergistic activation of transcription. *Mol. Cell* *1*, 277–287.
- Messina, J.P., Humphreys, I., Flaxman, A., Brown, A., Cooke, G.S., Pybus, O.G., and

Bibliographie

- Barnes, E. (2015). Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 61, 77–87.
- Mestan, J., Brockhaus, M., Kirchner, H., and Jacobsen, H. (1988). Antiviral Activity of Tumour Necrosis Factor. Synergism with Interferons and Induction of Oligo-2',5'-adenylate Synthetase. *Journal of General Virology*, 69, 3113–3120.
 - Mettenleiter, T.C. (2002). Herpesvirus assembly and egress. *J. Virol.* 76, 1537–1547.
 - Meunier, J.-C., Russell, R.S., Engle, R.E., Faulk, K.N., Purcell, R.H., and Emerson, S.U. (2008). Apolipoprotein C1 Association with Hepatitis C Virus. *J Virol* 82, 9647–9656.
 - Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., and Tschopp, J. (2005). Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 437, 1167–1172.
 - Miao, Z., Zhang, S., Ou, X., Li, S., Ma, Z., Wang, W., Peppelenbosch, M.P., Liu, J., and Pan, Q. (2019). Estimating the global prevalence, disease progression and clinical outcome of hepatitis delta virus infection. *J. Infect. Dis.*
 - Miller, L.D., Lee, K.C., Mochly-Rosen, D., and Cartwright, C.A. (2004). RACK1 regulates Src-mediated Sam68 and p190RhoGAP signaling. *Oncogene* 23, 5682–5686.
 - Min, J.-Y., and Subbarao, K. (2010). Cellular targets for influenza drugs. *Nat Biotechnol* 28, 239–240.
 - Minami, M., Daimon, Y., Mori, K., Takashima, H., Nakajima, T., Itoh, Y., and Okanoue, T. (2005). Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis in chronic hepatitis B patients as an early drastic genetic change leading to hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 24, 4340–4348.
 - Ming-Ju, H., Yih-Shou, H., Tzy-Yen, C., and Hui-Ling, C. (2011). Hepatitis C virus E2 protein induce reactive oxygen species (ROS)-related fibrogenesis in the HSC-T6 hepatic stellate cell line. *Journal of Cellular Biochemistry* 112, 233–243.
 - Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M., and Shimotohno, K. (2007). The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat. Cell Biol.* 9, 1089–1097.
 - Moolla, N., Kew, M., and Arbuthnot, P. (2002). Regulatory elements of hepatitis B virus transcription. *J. Viral Hepat.* 9, 323–331.
 - Moradpour, D., and Penin, F. (2013). Hepatitis C virus proteins: from structure to function. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 369, 113–142.
 - Morikawa, K., Lange, C.M., Gouttenoire, J., Meylan, E., Brass, V., Penin, F., and Moradpour, D. (2011). Nonstructural protein 3-4A: the Swiss army knife of hepatitis C

- virus. *J. Viral Hepat.* *18*, 305–315.
- Morrow, A.N., Schmeisser, H., Tsuno, T., and Zoon, K.C. (2011). A Novel Role for IFN-Stimulated Gene Factor 3II in IFN- γ Signaling and Induction of Antiviral Activity in Human Cells. *The Journal of Immunology* *186*, 1685–1693.
 - Moskophidis, D., Lechner, F., Pircher, H., and Zinkernagel, R.M. (1993). Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature* *362*, 758–761.
 - Mosley, R.T., Edwards, T.E., Murakami, E., Lam, A.M., Grice, R.L., Du, J., Sofia, M.J., Furman, P.A., and Otto, M.J. (2012). Structure of hepatitis C virus polymerase in complex with primer-template RNA. *J. Virol.* *86*, 6503–6511.
 - Moulard, M., and Decroly, E. (2000). Maturation of HIV envelope glycoprotein precursors by cellular endoproteases. *Biochim. Biophys. Acta* *1469*, 121–132.
 - Muñoz de Rueda, P., Casado, J., Patón, R., Quintero, D., Palacios, A., Gila, A., Quiles, R., León, J., Ruiz-Extremera, A., and Salmerón, J. (2008). Mutations in E2-PePHD, NS5A-PKRBD, NS5A-ISDR, and NS5A-V3 of hepatitis C virus genotype 1 and their relationships to pegylated interferon-ribavirin treatment responses. *J. Virol.* *82*, 6644–6653.
 - Murakami, K., Abe, M., Kageyama, T., Kamoshita, N., and Nomoto, A. (2001). Down-regulation of translation driven by hepatitis C virus internal ribosomal entry site by the 3' untranslated region of RNA. *Arch. Virol.* *146*, 729–741.
 - Myers, M.P., Andersen, J.N., Cheng, A., Tremblay, M.L., Horvath, C.M., Parisien, J.P., Salmeen, A., Barford, D., and Tonks, N.K. (2001). TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J. Biol. Chem.* *276*, 47771–47774.
 - Nadal, A., Martell, M., Lytle, J.R., Lyons, A.J., Robertson, H.D., Cabot, B., Esteban, J.I., Esteban, R., Guardia, J., and Gómez, J. (2002). Specific cleavage of hepatitis C virus RNA genome by human RNase P. *J. Biol. Chem.* *277*, 30606–30613.
 - Nagashio, R., Sato, Y., Matsumoto, T., Kageyama, T., Satoh, Y., Shinichiro, R., Masuda, N., Goshima, N., Jiang, S.-X., and Okayasu, I. (2010). Expression of RACK1 is a novel biomarker in pulmonary adenocarcinomas. *Lung Cancer* *69*, 54–59.
 - Nassal, M. (2008). Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. *Virus Res.* *134*, 235–249.
 - Nassal, M. (2015). HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut* *64*, 1972–1984.
 - Neer, E.J., Schmidt, C.J., Nambudripad, R., and Smith, T.F. (1994). The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* *371*, 297–300.

Bibliographie

- Negash, A.A., Ramos, H.J., Crochet, N., Lau, D.T.Y., Doehle, B., Papic, N., Delker, D.A., Jo, J., Bertoletti, A., Hagedorn, C.H., et al. (2013). IL-1 β production through the NLRP3 inflammasome by hepatic macrophages links hepatitis C virus infection with liver inflammation and disease. *PLoS Pathog.* 9, e1003330.
- Negash, A.A., Olson, R.M., Griffin, S., and Jr, M.G. (2019). Modulation of calcium signaling pathway by hepatitis C virus core protein stimulates NLRP3 inflammasome activation. *PLOS Pathogens* 15, e1007593.
- Neumann-Haefelin, C., and Thimme, R. (2013). Adaptive Immune Responses in Hepatitis C Virus Infection. In *Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy*, R. Bartenschlager, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer), pp. 243–262.
- Nezu, J., Tamai, I., Oku, A., Ohashi, R., Yabuuchi, H., Hashimoto, N., Nikaido, H., Sai, Y., Koizumi, A., Shoji, Y., et al. (1999). Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter. *Nat. Genet.* 21, 91–94.
- Nguyen, D.G., Yin, H., Zhou, Y., Wolff, K.C., Kuhen, K.L., and Caldwell, J.S. (2007). Identification of novel therapeutic targets for HIV infection through functional genomic cDNA screening. *Virology* 362, 16–25.
- Nguyen, H., Ramana, C.V., Bayes, J., and Stark, G.R. (2001). Roles of Phosphatidylinositol 3-Kinase in Interferon- γ -dependent Phosphorylation of STAT1 on Serine 727 and Activation of Gene Expression. *J. Biol. Chem.* 276, 33361–33368.
- Nguyen, H., Sankaran, S., and Dandekar, S. (2006). Hepatitis C virus core protein induces expression of genes regulating immune evasion and anti-apoptosis in hepatocytes. *Virology* 354, 58–68.
- Ni, Y., Lempp, F.A., Mehrle, S., Nkongolo, S., Kaufman, C., Fälth, M., Stindt, J., Königer, C., Nassal, M., Kubitz, R., et al. (2014). Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology* 146, 1070–1083.
- Nielsen, M.H., Flygaard, R.K., and Jenner, L.B. (2017). Structural analysis of ribosomal RACK1 and its role in translational control. *Cellular Signalling* 35, 272–281.
- Niepmann, M., and Gerresheim, G.K. (2020). Hepatitis C Virus Translation Regulation. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 2328.
- NIH (2002). National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of hepatitis C 2002 (June 10–12, 2002). *Gastroenterology* 123, 2082–2099.
- Nishitsuji, H., Funami, K., Shimizu, Y., Ujino, S., Sugiyama, K., Seya, T., Takaku, H., and

- Shimotohno, K. (2013). Hepatitis C virus infection induces inflammatory cytokines and chemokines mediated by the cross talk between hepatocytes and stellate cells. *J. Virol.* *87*, 8169–8178.
- Nitta, S., Sakamoto, N., Nakagawa, M., Kakinuma, S., Mishima, K., Kusano-Kitazume, A., Kiyohashi, K., Murakawa, M., Nishimura-Sakurai, Y., Azuma, S., et al. (2013). Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type I interferon-dependent innate immunity. *Hepatology* *57*, 46–58.
 - Nitta, S., Asahina, Y., Kato, T., Tsuchiya, J., Inoue-Shinomiya, E., Sato, A., Tsunoda, T., Miyoshi, M., Kawai-Kitahata, F., Murakawa, M., et al. (2019). Impact of novel NS5A resistance-associated substitutions of hepatitis C virus detected in treatment-experienced patients. *Scientific Reports* *9*, 1–9.
 - Niu, J., Shi, Y., Iwai, K., and Wu, Z.-H. (2011). LUBAC regulates NF- κ B activation upon genotoxic stress by promoting linear ubiquitination of NEMO. *EMBO J* *30*, 3741–3753.
 - Noguchi, T., Satoh, S., Noshi, T., Hatada, E., Fukuda, R., Kawai, A., Ikeda, S., Hijikata, M., and Shimotohno, K. (2001). Effects of Mutation in Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A on Interferon Resistance Mediated by Inhibition of PKR Kinase Activity in Mammalian Cells. *Microbiology and Immunology* *45*, 829–840.
 - Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team, Dawood, F.S., Jain, S., Finelli, L., Shaw, M.W., Lindstrom, S., Garten, R.J., Gubareva, L.V., Xu, X., Bridges, C.B., et al. (2009). Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N. Engl. J. Med.* *360*, 2605–2615.
 - Nusinzon, I., and Horvath, C.M. (2003). Interferon-stimulated transcription and innate antiviral immunity require deacetylase activity and histone deacetylase 1. *PNAS* *100*, 14742–14747.
 - Okamoto, H., Tsuda, F., Sakugawa, H., Sastrosoewignjo, R.I., Imai, M., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (1988). Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J. Gen. Virol.* *69 (Pt 10)*, 2575–2583.
 - Okesli, A., Khosla, C., and Bassik, M. (2017). Human Pyrimidine Nucleotide Biosynthesis as a Target for Antiviral Chemotherapy. *Curr Opin Biotechnol* *48*, 127–134.
 - OMS (2016). Prévenir la transmission périnatale du virus de l'hépatite B: Guide pour l'introduction et le renforcement de la vaccination à la naissance contre l'hépatite B (Organisation mondiale de la Santé).
 - OMS (2017a). Hepatitis B vaccines: WHO position paper – July 2017. *Wkly. Epidemiol. Rec.* *92*, 369–392.

Bibliographie

- OMS (2018). Implementation of hepatitis B birth dose vaccination – worldwide, 2016. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 93, 61–72.
- OMS Principaux repères sur l'hépatite C.
- OMS Hépatite B.
- OMS, W.H. (2017b). Global hepatitis report 2017 (World Health Organization).
- Osburn, W.O., Snider, A.E., Wells, B.L., Latanich, R., Bailey, J.R., Thomas, D.L., Cox, A.L., and Ray, S.C. (2014). Clearance of hepatitis C infection is associated with the early appearance of broad neutralizing antibody responses. *Hepatology* 59, 2140–2151.
- Oshiumi, H., Miyashita, M., Matsumoto, M., and Seya, T. (2013). A Distinct Role of Riplet-Mediated K63-Linked Polyubiquitination of the RIG-I Repressor Domain in Human Antiviral Innate Immune Responses. *PLoS Pathog* 9.
- Ostapchuk, P., Hearing, P., and Ganem, D. (1994). A dramatic shift in the transmembrane topology of a viral envelope glycoprotein accompanies hepatitis B viral morphogenesis. *EMBO J.* 13, 1048–1057.
- Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D.H., Cans, C., Neubauer, G., Bomsztyk, K., Superti-Furga, G., and Hentze, M.W. (2002). c-Src-Mediated Phosphorylation of hnRNP K Drives Translational Activation of Specifically Silenced mRNAs. *Molecular and Cellular Biology* 22, 4535–4543.
- Otsuka, M., Kato, N., Moriyama, M., Taniguchi, H., Wang, Y., Dharel, N., Kawabe, T., and Omata, M. (2005). Interaction between the HCV NS3 protein and the host TBK1 protein leads to inhibition of cellular antiviral responses. *Hepatology* 41, 1004–1012.
- Ott, J.J., Stevens, G.A., Groeger, J., and Wiersma, S.T. (2012). Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. *Vaccine* 30, 2212–2219.
- Owen, D.M., Huang, H., Ye, J., and Gale, M. (2009). Apolipoprotein E on hepatitis C virion facilitates infection through interaction with low-density lipoprotein receptor. *Virology* 394, 99–108.
- Paley, M.A., Kroy, D.C., Odorizzi, P.M., Johnnidis, J.B., Dolfi, D.V., Barnett, B.E., Bikoff, E.K., Robertson, E.J., Lauer, G.M., Reiner, S.L., et al. (2012). Progenitor and Terminal Subsets of CD8+ T Cells Cooperate to Contain Chronic Viral Infection. *Science* 338, 1220–1225.
- Palomares-Jerez, M.F., Guillén, J., and Villalaín, J. (2010). Interaction of the N-terminal segment of HCV protein NS5A with model membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1798, 1212–1224.

Bibliographie

- Palomares-Jerez, M.F., Nemesio, H., and Villalaín, J. (2012). Interaction with membranes of the full C-terminal domain of protein NS4B from hepatitis C virus. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 2536–2549.
- Palomares-Jerez, M.F., Nemesio, H., Franquelim, H.G., Castanho, M.A.R.B., and Villalaín, J. (2013). N-terminal AH2 segment of protein NS4B from hepatitis C virus. Binding to and interaction with model biomembranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 1938–1952.
- Paredes, A.M., and Blight, K.J. (2008). A genetic interaction between hepatitis C virus NS4B and NS3 is important for RNA replication. *J. Virol.* 82, 10671–10683.
- Park, J., Kang, W., Ryu, S.-W., Kim, W.-I., Chang, D.-Y., Lee, D.H., Park, D.Y., Choi, Y.-H., Choi, K., Shin, E.-C., et al. (2012). Hepatitis C virus infection enhances TNF α -induced cell death via suppression of NF- κ B. *Hepatology* 56, 831–840.
- Park, K.-J., Choi, S.-H., Choi, D.-H., Park, J.-M., Yie, S.W., Lee, S.Y., and Hwang, S.B. (2003). Hepatitis C Virus NS5A Protein Modulates c-Jun N-terminal Kinase through Interaction with Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 2. *J. Biol. Chem.* 278, 30711–30718.
- Park, S.M., Paek, K.Y., Hong, K.Y., Jang, C.J., Cho, S., Park, J.H., Kim, J.H., Jan, E., and Jang, S.K. (2011). Translation-competent 48S complex formation on HCV IRES requires the RNA-binding protein NSAP1. *Nucleic Acids Res.* 39, 7791–7802.
- Patel, K., Muir, A.J., and McHutchison, J.G. (2006). Diagnosis and treatment of chronic hepatitis C infection. *BMJ* 332, 1013–1017.
- Patient, R., Hourieux, C., and Roingeard, P. (2009). Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles. *Cell Microbiol* 11, 1561–1570.
- Patzer, E.J., Nakamura, G.R., Simonsen, C.C., Levinson, A.D., and Brands, R. (1986). Intracellular assembly and packaging of hepatitis B surface antigen particles occur in the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* 58, 884–892.
- Paul, D., and Bartenschlager, R. (2013). Architecture and biogenesis of plus-strand RNA virus replication factories. *World J Virol* 2, 32–48.
- Paul, D., Romero-Brey, I., Gouttenoire, J., Stoitsova, S., Krijnse-Locker, J., Moradpour, D., and Bartenschlager, R. (2011). NS4B self-interaction through conserved C-terminal elements is required for the establishment of functional hepatitis C virus replication complexes. *J. Virol.* 85, 6963–6976.
- Paul, D., Madan, V., Ramirez, O., Bencun, M., Stoeck, I.K., Jirasko, V., and Bartenschlager, R. (2018). Glycine Zipper Motifs in Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 4B Are Required for the Establishment of Viral Replication Organelles. *J. Virol.* 92.

Bibliographie

- Paulson, M., Press, C., Smith, E., Tanese, N., and Levy, D.E. (2002). IFN-Stimulated transcription through a TBP-free acetyltransferase complex escapes viral shutoff. *Nature Cell Biology* 4, 140–147.
- Pawlotsky, J.-M. (2014). New hepatitis C therapies: the toolbox, strategies, and challenges. *Gastroenterology* 146, 1176–1192.
- Pei, Y., Wang, C., Ben, H., Wang, L., Ma, Y., Ma, Q., Xiang, Y., Zhang, L., and Liu, G. (2019). Discovery of New Hepatitis B Virus Capsid Assembly Modulators by an Optimal High-Throughput Cell-Based Assay. *ACS Infect. Dis.* 5, 778–787.
- Penin, F., Dubuisson, J., Rey, F.A., Moradpour, D., and Pawlotsky, J.-M. (2004). Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 39, 5–19.
- Pestka, J.M., Zeisel, M.B., Bläser, E., Schürmann, P., Bartosch, B., Cosset, F.-L., Patel, A.H., Meisel, H., Baumert, J., Viazov, S., et al. (2007). Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *PNAS* 104, 6025–6030.
- Pestova, T.V., Shatsky, I.N., Fletcher, S.P., Jackson, R.J., and Hellen, C.U.T. (1998). A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev* 12, 67–83.
- Pestova, T.V., de Breyne, S., Pisarev, A.V., Abaeva, I.S., and Hellen, C.U.T. (2008). eIF2-dependent and eIF2-independent modes of initiation on the CSFV IRES: a common role of domain II. *The EMBO Journal* 27, 1060–1072.
- Petta, S., Maida, M., Macaluso, F.S., Barbara, M., Licata, A., Craxì, A., and Cammà, C. (2016). Hepatitis C Virus Infection Is Associated With Increased Cardiovascular Mortality: A Meta-Analysis of Observational Studies. *Gastroenterology* 150, 145-155.e4.
- Pham, T.N.Q., King, D., Macparland, S.A., McGrath, J.S., Reddy, S.B., Bursey, F.R., and Michalak, T.I. (2008). Hepatitis C virus replicates in the same immune cell subsets in chronic hepatitis C and occult infection. *Gastroenterology* 134, 812–822.
- Phan, T., Kohlway, A., Dimberu, P., Pyle, A.M., and Lindenbach, B.D. (2011). The acidic domain of hepatitis C virus NS4A contributes to RNA replication and virus particle assembly. *J. Virol.* 85, 1193–1204.
- Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., Abid, K., Negro, F., Dreux, M., Cosset, F.-L., et al. (2006). Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7408–7413.

Bibliographie

- Pietschmann, T., Zayas, M., Meuleman, P., Long, G., Appel, N., Koutsoudakis, G., Kallis, S., Leroux-Roels, G., Lohmann, V., and Bartenschlager, R. (2009). Production of Infectious Genotype 1b Virus Particles in Cell Culture and Impairment by Replication Enhancing Mutations. *PLOS Pathogens* 5, e1000475.
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A.J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G., et al. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282, 938–941.
- Pimpin, L., Cortez-Pinto, H., Negro, F., Corbould, E., Lazarus, J.V., Webber, L., and Sheron, N. (2018). Burden of liver disease in Europe: Epidemiology and analysis of risk factors to identify prevention policies. *Journal of Hepatology* 69, 718–735.
- Pindel, A., and Sadler, A. (2010). The Role of Protein Kinase R in the Interferon Response. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 31, 59–70.
- Piver, E., Boyer, A., Gaillard, J., Bull, A., Beaumont, E., Roingeard, P., and Meunier, J.-C. (2017). Ultrastructural organisation of HCV from the bloodstream of infected patients revealed by electron microscopy after specific immunocapture. *Gut* 66, 1487–1495.
- Ploen, D., Hafirassou, M.L., Himmelsbach, K., Sauter, D., Biniossek, M.L., Weiss, T.S., Baumert, T.F., Schuster, C., and Hildt, E. (2013). TIP47 plays a crucial role in the life cycle of hepatitis C virus. *J. Hepatol.* 58, 1081–1088.
- Ploss, A., Evans, M.J., Gaysinskaya, V.A., Panis, M., You, H., de Jong, Y.P., and Rice, C.M. (2009). Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 457, 882–886.
- Podlaha, O., Wu, G., Downie, B., Ramamurthy, R., Gaggar, A., Subramanian, M., Ye, Z., and Jiang, Z. (2019). Genomic modeling of hepatitis B virus integration frequency in the human genome. *PLoS One* 14.
- Poeck, H., Bscheider, M., Gross, O., Finger, K., Roth, S., Rebsamen, M., Hanneschläger, N., Schlee, M., Rothenfusser, S., Barchet, W., et al. (2010). Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 beta production. *Nat. Immunol.* 11, 63–69.
- Poncz, M., Surrey, S., LaRocco, P., Weiss, M.J., Rappaport, E.F., Conway, T.M., and Schwartz, E. (1987). Cloning and characterization of platelet factor 4 cDNA derived from a human erythroleukemic cell line. *Blood* 69, 219–223.
- Poordad, F., and Dieterich, D. (2012). Treating hepatitis C: current standard of care and emerging direct-acting antiviral agents. *Journal of Viral Hepatitis* 19, 449–464.
- Popescu, C.-I., Callens, N., Trinel, D., Roingeard, P., Moradpour, D., Descamps, V.,

Bibliographie

- Duverlie, G., Penin, F., Héliot, L., Rouillé, Y., et al. (2011). NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. *PLoS Pathog.* 7, e1001278.
- Prange, R., and Streeck, R.E. (1995). Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins. *EMBO J.* 14, 247–256.
 - Prince, A.M. (1968). An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 60, 814–821.
 - Prusty, B.K., and Das, B.C. (2005). Constitutive activation of transcription factor AP-1 in cervical cancer and suppression of human papillomavirus (HPV) transcription and AP-1 activity in HeLa cells by curcumin. *Int. J. Cancer* 113, 951–960.
 - Pudi, R., Srinivasan, P., and Das, S. (2004). La protein binding at the GCAC site near the initiator AUG facilitates the ribosomal assembly on the hepatitis C virus RNA to influence internal ribosome entry site-mediated translation. *J. Biol. Chem.* 279, 29879–29888.
 - Qi, Y., Gao, Z., Xu, G., Peng, B., Liu, C., Yan, H., Yao, Q., Sun, G., Liu, Y., Tang, D., et al. (2016). DNA Polymerase κ Is a Key Cellular Factor for the Formation of Covalently Closed Circular DNA of Hepatitis B Virus. *PLOS Pathogens* 12, e1005893.
 - Quade, N., Boehringer, D., Leibundgut, M., van den Heuvel, J., and Ban, N. (2015). Cryo-EM structure of Hepatitis C virus IRES bound to the human ribosome at 3.9-Å resolution. *Nature Communications* 6, 1–9.
 - Quarleri, J. (2014). Core promoter: A critical region where the hepatitis B virus makes decisions. *World J Gastroenterol* 20, 425–435.
 - Qureshi, S.A., Salditt-Georgieff, M., and Darnell, J.E. (1995). Tyrosine-phosphorylated Stat1 and Stat2 plus a 48-kDa protein all contact DNA in forming interferon-stimulated-gene factor 3. *PNAS* 92, 3829–3833.
 - Rabe, B., Glebe, D., and Kann, M. (2006). Lipid-mediated introduction of hepatitis B virus capsids into nonsusceptible cells allows highly efficient replication and facilitates the study of early infection events. *J. Virol.* 80, 5465–5473.
 - Raju, T.N. (1999). The Nobel chronicles. 1976: Baruch S Blumberg (b 1925); Daniel Carleton Gajdusek (1923). *Lancet* 354, 1394.
 - Ramsauer, K., Sadzak, I., Porras, A., Pilz, A., Nebreda, A.R., Decker, T., and Kovarik, P. (2002). p38 MAPK enhances STAT1-dependent transcription independently of Ser-727 phosphorylation. *PNAS* 99, 12859–12864.
 - Randall, G., Panis, M., Cooper, J.D., Tellinghuisen, T.L., Sukhodolets, K.E., Pfeffer, S., Landthaler, M., Landgraf, P., Kan, S., Lindenbach, B.D., et al. (2007). Cellular cofactors

- affecting hepatitis C virus infection and replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 12884–12889.
- Rapti, I., and Hadziyannis, S. (2015). Risk for hepatocellular carcinoma in the course of chronic hepatitis B virus infection and the protective effect of therapy with nucleos(t)ide analogues. *World J Hepatol* *7*, 1064–1073.
 - Reiberger, T., Aberle, J.H., Kundi, M., Kohrgruber, N., Rieger, A., Gangl, A., Holzmann, H., and Peck-Radosavljevic, M. (2008). IP-10 correlates with hepatitis C viral load, hepatic inflammation and fibrosis and predicts hepatitis C virus relapse or non-response in HIV-HCV coinfection. *Antivir. Ther. (Lond.)* *13*, 969–976.
 - Reiss, S., Rebhan, I., Backes, P., Romero-Brey, I., Erfle, H., Matula, P., Kaderali, L., Poenisch, M., Blankenburg, H., Hiet, M.-S., et al. (2011). Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host Microbe* *9*, 32–45.
 - Ríos-Ocampo, W.A., Daemen, T., Buist-Homan, M., Faber, K.N., Navas, M.-C., and Moshage, H. (2019). Hepatitis C virus core or NS3/4A protein expression preconditions hepatocytes against oxidative stress and endoplasmic reticulum stress. *Redox Rep.* *24*, 17–26.
 - Ríos-Ocampo, W.A., Navas, M.-C., Buist-Homan, M., Faber, K.N., Daemen, T., and Moshage, H. (2020). Hepatitis C Virus Proteins Core and NS5A Are Highly Sensitive to Oxidative Stress-Induced Degradation after eIF2 α /ATF4 Pathway Activation. *Viruses* *12*, 425.
 - Risebro, C.A., Smart, N., Dupays, L., Breckenridge, R., Mohun, T.J., and Riley, P.R. (2006). Hand1 regulates cardiomyocyte proliferation versus differentiation in the developing heart. *Development* *133*, 4595–4606.
 - Roder, A.E., Vazquez, C., and Horner, S.M. (2019). The acidic domain of the hepatitis C virus NS4A protein is required for viral assembly and envelopment through interactions with the viral E1 glycoprotein. *PLoS Pathog.* *15*, e1007163.
 - Romero-Brey, I., Merz, A., Chiramel, A., Lee, J.-Y., Chlanda, P., Haselman, U., Santarella-Mellwig, R., Habermann, A., Hoppe, S., Kallis, S., et al. (2012). Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog.* *8*, e1003056.
 - Romero-Brey, I., Berger, C., Kallis, S., Kolovou, A., Paul, D., Lohmann, V., and Bartenschlager, R. (2015). NS5A Domain 1 and Polyprotein Cleavage Kinetics Are Critical for Induction of Double-Membrane Vesicles Associated with Hepatitis C Virus Replication.

- MBio 6, e00759.
- Romero-López, C., Ríos-Marco, P., Berzal-Herranz, B., and Berzal-Herranz, A. (2018). The HCV genome domains 5BSL3.1 and 5BSL3.3 act as managers of translation. *Scientific Reports* 8, 1–12.
 - Ron, D., Chen, C.H., Caldwell, J., Jamieson, L., Orr, E., and Mochly-Rosen, D. (1994). Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 839–843.
 - Ross-Thriepland, D., and Harris, M. (2015). Hepatitis C virus NS5A: enigmatic but still promiscuous 10 years on! *J. Gen. Virol.* 96, 727–738.
 - Roy, S.K., Hu, J., Meng, Q., Xia, Y., Shapiro, P.S., Reddy, S.P.M., Platanius, L.C., Lindner, D.J., Johnson, P.F., Pritchard, C., et al. (2002). MEKK1 plays a critical role in activating the transcription factor C/EBP-beta-dependent gene expression in response to IFN-gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 7945–7950.
 - Roychoudhury, S., and Shih, C. (1990). cis rescue of a mutated reverse transcriptase gene of human hepatitis B virus by creation of an internal ATG. *J Virol* 64, 1063–1069.
 - Ruan, Y., Sun, L., Hao, Y., Wang, L., Xu, J., Zhang, W., Xie, J., Guo, L., Zhou, L., Yun, X., et al. (2012). Ribosomal RACK1 promotes chemoresistance and growth in human hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest* 122, 2554–2566.
 - Ruby, J., Bluethmann, H., and Peschon, J.J. (1997). Antiviral Activity of Tumor Necrosis Factor (TNF) Is Mediated via p55 and p75 TNF Receptors. *J Exp Med* 186, 1591–1596.
 - Ruiz Carrillo, D., Chandrasekaran, R., Nilsson, M., Cornvik, T., Liew, C.W., Tan, S.M., and Lescar, J. (2012). Structure of human Rack1 protein at a resolution of 2.45 Å. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 68, 867–872.
 - Rupp, D., and Bartenschlager, R. (2014). Targets for Antiviral Therapy of Hepatitis C. *Semin Liver Dis* 34, 9–21.
 - Ryckman, C., Robichaud, G.A., Roy, J., Cantin, R., Tremblay, M.J., and Tessier, P.A. (2002). HIV-1 Transcription and Virus Production Are Both Accentuated by the Proinflammatory Myeloid-Related Proteins in Human CD4+ T Lymphocytes. *The Journal of Immunology* 169, 3307–3313.
 - Rydell, G.E., Prakash, K., Norder, H., and Lindh, M. (2017). Hepatitis B surface antigen on subviral particles reduces the neutralizing effect of anti-HBs antibodies on hepatitis B viral particles in vitro. *Virology* 509, 67–70.
 - Sainz, B., and Chisari, F.V. (2006). Production of Infectious Hepatitis C Virus by Well-Differentiated, Growth-Arrested Human Hepatoma-Derived Cells. *J Virol* 80, 10253–

10257.

- Saito, T., Owen, D.M., Jiang, F., Marcotrigiano, J., and Jr, M.G. (2008). Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature* *454*, 523–527.
- Sakamoto, S., Potla, R., and Lerner, A.C. (2004). Histone Deacetylase Activity Is Required to Recruit RNA Polymerase II to the Promoters of Selected Interferon-stimulated Early Response Genes. *J. Biol. Chem.* *279*, 40362–40367.
- Santé Publique France (2020). Infections à Papillomavirus humains (HPV).
- Sanz-Cameno, P., Martín-Vílchez, S., Lara-Pezzi, E., Borque, M.J., Salmerón, J., Muñoz de Rueda, P., Solís, J.A., López-Cabrera, M., and Moreno-Otero, R. (2006). Hepatitis B virus promotes angiopoietin-2 expression in liver tissue: role of HBV x protein. *Am. J. Pathol.* *169*, 1215–1222.
- Sarkis, P.T.N., Ying, S., Xu, R., and Yu, X.-F. (2006). STAT1-independent cell type-specific regulation of antiviral APOBEC3G by IFN- α . *J. Immunol.* *177*, 4530–4540.
- Sarnow, P., and Sagan, S.M. (2016). Unraveling the Mysterious Interactions Between Hepatitis C Virus RNA and Liver-Specific MicroRNA-122. *Annu Rev Virol* *3*, 309–332.
- Sasaki, R., Devhare, P.B., Steele, R., Ray, R., and Ray, R.B. (2017). Hepatitis C virus-induced CCL5 secretion from macrophages activates hepatic stellate cells. *Hepatology* *66*, 746–757.
- Sato, T., Takahashi, H., Hatakeyama, S., Iguchi, A., and Ariga, T. (2015). The TRIM-FLMN protein TRIM45 directly interacts with RACK1 and negatively regulates PKC-mediated signaling pathway. *Oncogene* *34*, 1280–1291.
- Sato, Y., Kato, J., Takimoto, R., Takada, K., Kawano, Y., Miyanishi, K., Kobune, M., Sato, Y., Takayama, T., Matunaga, T., et al. (2006). Hepatitis C virus core protein promotes proliferation of human hepatoma cells through enhancement of transforming growth factor alpha expression via activation of nuclear factor-kappaB. *Gut* *55*, 1801–1808.
- Savidis, G., McDougall, W.M., Meraner, P., Perreira, J.M., Portmann, J.M., Trincucci, G., John, S.P., Aker, A.M., Renzette, N., Robbins, D.R., et al. (2016). Identification of Zika Virus and Dengue Virus Dependency Factors using Functional Genomics. *Cell Rep* *16*, 232–246.
- Scaglia, F., Wang, Y., and Longo, N. (1999). Functional characterization of the carnitine transporter defective in primary carnitine deficiency. *Arch. Biochem. Biophys.* *364*, 99–106.
- Scheel, T.K.H., and Rice, C.M. (2013). Understanding the hepatitis C virus life cycle paves

- the way for highly effective therapies. *Nature Medicine* 19, 837–849.
- Schenk, C., Meyrath, M., Warnken, U., Schnölzer, M., Mier, W., Harak, C., and Lohmann, V. (2018). Characterization of a Threonine-Rich Cluster in Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A and Its Contribution to Hyperphosphorylation. *J. Virol.* 92.
 - Schmidt-Mende, J., Bieck, E., Hugle, T., Penin, F., Rice, C.M., Blum, H.E., and Moradpour, D. (2001). Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 276, 44052–44063.
 - Schmitt, S., Glebe, D., Tolle, T.K., Lochnit, G., Linder, D., Geyer, R., and Gerlich, W.H. (2004). Structure of pre-S2 N- and O-linked glycans in surface proteins from different genotypes of hepatitis B virus. *J. Gen. Virol.* 85, 2045–2053.
 - Schmitz, A., Schwarz, A., Foss, M., Zhou, L., Rabe, B., Hoellenriegel, J., Stoeber, M., Panté, N., and Kann, M. (2010). Nucleoporin 153 Arrests the Nuclear Import of Hepatitis B Virus Capsids in the Nuclear Basket. *PLoS Pathog* 6.
 - Scholte, H.R., Rodrigues Pereira, R., de Jonge, P.C., Luyt-Houwen, I.E., Hedwig, M., Verduin, M., and Ross, J.D. (1990). Primary carnitine deficiency. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 28, 351–357.
 - Schroder, K., and Tschopp, J. (2010). The inflammasomes. *Cell* 140, 821–832.
 - Schult, P., Roth, H., Adams, R.L., Mas, C., Imbert, L., Orlik, C., Ruggieri, A., Pyle, A.M., and Lohmann, V. (2018). microRNA-122 amplifies hepatitis C virus translation by shaping the structure of the internal ribosomal entry site. *Nature Communications* 9, 1–14.
 - Schulze zur Wiesch, J., Ciuffreda, D., Lewis-Ximenez, L., Kasprowicz, V., Nolan, B.E., Streeck, H., Aneja, J., Reyor, L.L., Allen, T.M., Lohse, A.W., et al. (2012). Broadly directed virus-specific CD4+ T cell responses are primed during acute hepatitis C infection, but rapidly disappear from human blood with viral persistence. *J Exp Med* 209, 61–75.
 - Schulze-Krebs, A., Preimel, D., Popov, Y., Bartenschlager, R., Lohmann, V., Pinzani, M., and Schuppan, D. (2005). Hepatitis C virus-replicating hepatocytes induce fibrogenic activation of hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 129, 246–258.
 - Schuster, C., Isel, C., Imbert, I., Ehresmann, C., Marquet, R., and Kieny, M.P. (2002). Secondary Structure of the 3' Terminus of Hepatitis C Virus Minus-Strand RNA. *Journal of Virology* 76, 8058–8068.
 - Schwabe, R.F., Bradham, C.A., Uehara, T., Hatano, E., Bennett, B.L., Schoonhoven, R., and Brenner, D.A. (2003). c-Jun-N-terminal kinase drives cyclin D1 expression and proliferation during liver regeneration. *Hepatology* 37, 824–832.
 - Schweitzer, A., Horn, J., Mikolajczyk, R.T., Krause, G., and Ott, J.J. (2015). Estimations of

- worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *Lancet* 386, 1546–1555.
- Scrima, N., Caillet-Saguy, C., Ventura, M., Harrus, D., Astier-Gin, T., and Bressanelli, S. (2012). Two crucial early steps in RNA synthesis by the hepatitis C virus polymerase involve a dual role of residue 405. *J. Virol.* 86, 7107–7117.
 - Seeff, L.B., Beebe, G.W., Hoofnagle, J.H., Norman, J.E., Buskell-Bales, Z., Waggoner, J.G., Kaplowitz, N., Koff, R.S., Petrini, J.L., and Schiff, E.R. (1987). A serologic follow-up of the 1942 epidemic of post-vaccination hepatitis in the United States Army. *N. Engl. J. Med.* 316, 965–970.
 - Seeger, C., and Mason, W.S. (2000). Hepatitis B virus biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 51–68.
 - Sekiba, K., Otsuka, M., Ohno, M., Yamagami, M., Kishikawa, T., Seimiya, T., Suzuki, T., Tanaka, E., Ishibashi, R., Funato, K., et al. (2019). Pevonedistat, a Neuronal Precursor Cell-Expressed Developmentally Down-Regulated Protein 8–Activating Enzyme Inhibitor, Is a Potent Inhibitor of Hepatitis B Virus. *Hepatology* 69, 1903–1915.
 - Sells, M.A., Zelent, A.Z., Shvartsman, M., and Acs, G. (1988). Replicative intermediates of hepatitis B virus in HepG2 cells that produce infectious virions. *J. Virol.* 62, 2836–2844.
 - Sène, D., Levasseur, F., Abel, M., Lambert, M., Camous, X., Hernandez, C., Pène, V., Rosenberg, A.R., Jouvin-Marche, E., Marche, P.N., et al. (2010). Hepatitis C Virus (HCV) Evades NKG2D-Dependent NK Cell Responses through NS5A-Mediated Imbalance of Inflammatory Cytokines. *PLoS Pathog* 6.
 - Seo, S.H., and Webster, R.G. (2002). Tumor Necrosis Factor Alpha Exerts Powerful Anti-Influenza Virus Effects in Lung Epithelial Cells. *Journal of Virology* 76, 1071–1076.
 - Serfaty, L., and Capeau, J. (2009). Hepatitis C, insulin resistance and diabetes: clinical and pathogenic data. *Liver International* 29, 13–25.
 - Sesmero, E., and Thorpe, I.F. (2015). Using the Hepatitis C Virus RNA-Dependent RNA Polymerase as a Model to Understand Viral Polymerase Structure, Function and Dynamics. *Viruses* 7, 3974–3994.
 - Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.-K., and Chen, Z.J. (2005). Identification and Characterization of MAVS, a Mitochondrial Antiviral Signaling Protein that Activates NF- κ B and IRF3. *Cell* 122, 669–682.
 - Shakespear, M.R., Halili, M.A., Irvine, K.M., Fairlie, D.P., and Sweet, M.J. (2011). Histone deacetylases as regulators of inflammation and immunity. *Trends in Immunology* 32, 335–343.

Bibliographie

- Shapira, S.D., Gat-Viks, I., Shum, B.O.V., Dricot, A., Degrace, M.M., Liguio, W., Gupta, P.B., Hao, T., Silver, S.J., Root, D.E., et al. (2009). A physical and regulatory map of host-influenza interactions reveals pathways in H1N1 infection. *Cell* *139*, 1255–1267.
- Sharma, N.R., Mateu, G., Dreux, M., Grakoui, A., Cosset, F.-L., and Melikyan, G.B. (2011). Hepatitis C virus is primed by CD81 protein for low pH-dependent fusion. *J. Biol. Chem.* *286*, 30361–30376.
- Shelness, G.S., and Sellers, J.A. (2001). Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. *Curr. Opin. Lipidol.* *12*, 151–157.
- Shi, G., Ando, T., Suzuki, R., Matsuda, M., Nakashima, K., Ito, M., Omatsu, T., Oba, M., Ochiai, H., Kato, T., et al. (2016). Involvement of the 3' Untranslated Region in Encapsidation of the Hepatitis C Virus. *PLOS Pathogens* *12*, e1005441.
- Shimakami, T., Yamane, D., Jangra, R.K., Kempf, B.J., Spaniel, C., Barton, D.J., and Lemon, S.M. (2012). Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2–miR-122 complex. *PNAS* *109*, 941–946.
- Shimizu, Y.K. (1992). Ultrastructural Alterations and Expression of Cytoplasmic Antigen 48-1 in Hepatocytes in Association with Hepatitis C Virus Infection. *Microbiology and Immunology* *36*, 911–922.
- Shimizu, Y., Shirasago, Y., Kondoh, M., Suzuki, T., Wakita, T., Hanada, K., Yagi, K., and Fukasawa, M. (2018). Monoclonal Antibodies against Occludin Completely Prevented Hepatitis C Virus Infection in a Mouse Model. *J. Virol.* *92*.
- Shin, E.-C., Sung, P.S., and Park, S.-H. (2016). Immune responses and immunopathology in acute and chronic viral hepatitis. *Nat. Rev. Immunol.* *16*, 509–523.
- Shirasago, Y., Shimizu, Y., Tanida, I., Suzuki, T., Suzuki, R., Sugiyama, K., Wakita, T., Hanada, K., Yagi, K., Kondoh, M., et al. (2016). Occludin-Knockout Human Hepatic Huh7.5.1-8-Derived Cells Are Completely Resistant to Hepatitis C Virus Infection. *Biol. Pharm. Bull.* *39*, 839–848.
- Shrivastava, A., Manna, S.K., Ray, R., and Aggarwal, B.B. (1998). Ectopic Expression of Hepatitis C Virus Core Protein Differentially Regulates Nuclear Transcription Factors. *Journal of Virology* *72*, 9722–9728.
- Shrivastava, S., Mukherjee, A., Ray, R., and Ray, R.B. (2013). Hepatitis C virus induces interleukin-1 β (IL-1 β)/IL-18 in circulatory and resident liver macrophages. *J. Virol.* *87*, 12284–12290.
- Shum, D., Smith, J.L., Hirsch, A.J., Bhinder, B., Radu, C., Stein, D.A., Nelson, J.A., Früh, K., and Djaballah, H. (2010). High-Content Assay to Identify Inhibitors of Dengue Virus

- Infection. *Assay Drug Dev Technol* 8, 553–570.
- Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y.-J. (1999). The Nature of the Principal Type 1 Interferon-Producing Cells in Human Blood. *Science* 284, 1835–1837.
 - Simoncic, P.D., Lee-Loy, A., Barber, D.L., Tremblay, M.L., and McGlade, C.J. (2002). The T Cell Protein Tyrosine Phosphatase Is a Negative Regulator of Janus Family Kinases 1 and 3. *Current Biology* 12, 446–453.
 - Sizova, D.V., Kolupaeva, V.G., Pestova, T.V., Shatsky, I.N., and Hellen, C.U. (1998). Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and classical swine fever virus RNAs. *J. Virol.* 72, 4775–4782.
 - Smed-Sørensen, A., Oh, D.Y., Oshiumi, H., and Hsu, A.C.-Y. (2018). Editorial: Emerging Viruses: Host Immunity and Novel Therapeutic Interventions. *Front. Immunol.* 9.
 - Smith, R.M., Walton, C.M., Wu, C.H., and Wu, G.Y. (2002). Secondary structure and hybridization accessibility of hepatitis C virus 3'-terminal sequences. *J. Virol.* 76, 9563–9574.
 - Smith, T.F., Gaitatzes, C., Saxena, K., and Neer, E.J. (1999). The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends in Biochemical Sciences* 24, 181–185.
 - Sokal, E.M., Paganelli, M., Wirth, S., Socha, P., Vajro, P., Lacaille, F., Kelly, D., Mieli-Vergani, G., and European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (2013). Management of chronic hepatitis B in childhood: ESPGHAN clinical practice guidelines: consensus of an expert panel on behalf of the European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J. Hepatol.* 59, 814–829.
 - Sommereyns, C., Paul, S., Staeheli, P., and Michiels, T. (2008). IFN-lambda (IFN-lambda) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo. *PLoS Pathog.* 4, e1000017.
 - Song, Y., Friebe, P., Tzima, E., Jünemann, C., Bartenschlager, R., and Niepmann, M. (2006). The Hepatitis C Virus RNA 3'-Untranslated Region Strongly Enhances Translation Directed by the Internal Ribosome Entry Site. *Journal of Virology* 80, 11579–11588.
 - Spahn, C.M.T., Kieft, J.S., Grassucci, R.A., Penczek, P.A., Zhou, K., Doudna, J.A., and Frank, J. (2001). Hepatitis C Virus IRES RNA-Induced Changes in the Conformation of the 40S Ribosomal Subunit. *Science* 291, 1959–1962.
 - Standring, D.N., Rutter, W.J., Varmus, H.E., and Ganem, D. (1984). Transcription of the hepatitis B surface antigen gene in cultured murine cells initiates within the presurface region. *J. Virol.* 50, 563–571.

Bibliographie

- Stark, G.R., and Darnell, J.E. (2012). The JAK-STAT Pathway at Twenty. *Immunity* 36, 503–514.
- Stertz, S., and Shaw, M.L. (2011). Uncovering the global host cell requirements for influenza virus replication via RNAi screening. *Microbes Infect* 13, 516–525.
- Stirk, H.J., Thornton, J.M., and Howard, C.R. (1992). A topological model for hepatitis B surface antigen. *Intervirology* 33, 148–158.
- Stirnimann, C.U., Petsalaki, E., Russell, R.B., and Müller, C.W. (2010). WD40 proteins propel cellular networks. *Trends in Biochemical Sciences* 35, 565–574.
- Stoeck, I.K., Lee, J.-Y., Tabata, K., Romero-Brey, I., Paul, D., Schult, P., Lohmann, V., Kaderali, L., and Bartenschlager, R. (2018). Hepatitis C Virus Replication Depends on Endosomal Cholesterol Homeostasis. *J. Virol.* 92.
- Stone, A.E.L., Mitchell, A., Brownell, J., Miklin, D.J., Golden-Mason, L., Polyak, S.J., Jr, M.J.G., and Rosen, H.R. (2014). Hepatitis C Virus Core Protein Inhibits Interferon Production by a Human Plasmacytoid Dendritic Cell Line and Dysregulates Interferon Regulatory Factor-7 and Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) 1 Protein Expression. *PLOS ONE* 9, e95627.
- Strickland, G.T. (2006). Liver disease in Egypt: hepatitis C superseded schistosomiasis as a result of iatrogenic and biological factors. *Hepatology* 43, 915–922.
- Stross, C., Shimakami, T., Haselow, K., Ahmad, M.Q., Zeuzem, S., Lange, C.M., and Welsch, C. (2016). Natural HCV variants with increased replicative fitness due to NS3 helicase mutations in the C-terminal helix α 18. *Scientific Reports* 6, 1–11.
- Suarez, A.A.R., Baumert, T.F., and Lupberger, J. (2018). Beyond viral dependence: The pathological consequences of HCV-induced EGF signaling. *Journal of Hepatology* 69, 564–566.
- Suda, K.J., Halbur, D.J., Hunkler, R.J., Matusiak, L.M., and Schumock, G.T. (2017). Spending on Hepatitis C Antivirals in the United States, 2009-2015. *Pharmacotherapy* 37, 65–70.
- Sulkowski, M.S., Vargas, H.E., Di Bisceglie, A.M., Kuo, A., Reddy, K.R., Lim, J.K., Morelli, G., Darling, J.M., Feld, J.J., Brown, R.S., et al. (2016). Effectiveness of Simeprevir Plus Sofosbuvir, With or Without Ribavirin, in Real-World Patients With HCV Genotype 1 Infection. *Gastroenterology* 150, 419–429.
- Summers, J., O’Connell, A., and Millman, I. (1975). Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 4597–4601.

Bibliographie

- Summers, J., Smith, P.M., and Horwich, A.L. (1990). Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification. *J Virol* *64*, 2819–2824.
- Sumpter, R., Loo, Y.-M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S.M., and Gale, M. (2005). Regulating Intracellular Antiviral Defense and Permissiveness to Hepatitis C Virus RNA Replication through a Cellular RNA Helicase, RIG-I. *J Virol* *79*, 2689–2699.
- Sun, X.L., Johnson, R.B., Hockman, M.A., and Wang, Q.M. (2000). De novo RNA synthesis catalyzed by HCV RNA-dependent RNA polymerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *268*, 798–803.
- Sunbul, M. (2014). Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance. *World J Gastroenterol* *20*, 5427–5434.
- Sung, P.S., Cheon, H., Cho, C.H., Hong, S.-H., Park, D.Y., Seo, H.-I., Park, S.-H., Yoon, S.K., Stark, G.R., and Shin, E.-C. (2015). Roles of unphosphorylated ISGF3 in HCV infection and interferon responsiveness. *PNAS* *112*, 10443–10448.
- Sung, V.M.-H., Shimodaira, S., Doughty, A.L., Picchio, G.R., Can, H., Yen, T.S.B., Lindsay, K.L., Levine, A.M., and Lai, M.M.C. (2003). Establishment of B-cell lymphoma cell lines persistently infected with hepatitis C virus in vivo and in vitro: the apoptotic effects of virus infection. *J. Virol.* *77*, 2134–2146.
- Sureau, C., and Negro, F. (2016). The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis. *J. Hepatol.* *64*, S102–S116.
- Sureau, C., and Salisse, J. (2013). A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus A-determinant. *Hepatology* *57*, 985–994.
- Sureau, C., Guerra, B., and Lanford, R.E. (1993). Role of the large hepatitis B virus envelope protein in infectivity of the hepatitis delta virion. *J. Virol.* *67*, 366–372.
- Sutton, P., Borgia, J.A., Bonomi, P., and Plate, J.M. (2013). Lyn, a Src family kinase, regulates activation of epidermal growth factor receptors in lung adenocarcinoma cells. *Mol Cancer* *12*, 76.
- Svoboda, P. (2015). A toolbox for miRNA analysis. *FEBS Lett.* *589*, 1694–1701.
- Syed, G.H., Khan, M., Yang, S., and Siddiqui, A. (2017). Hepatitis C Virus Lipoviroparticles Assemble in the Endoplasmic Reticulum (ER) and Bud off from the ER to the Golgi Compartment in COPII Vesicles. *J Virol* *91*.
- Szabo, G., and Petrasek, J. (2015). Inflammasome activation and function in liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* *12*, 387–400.
- Tabata, K., Neufeldt, C.J., and Bartenschlager, R. (2020). Hepatitis C Virus Replication.

- Cold Spring Harb Perspect Med *10*.
- Tabor, E., Gerety, R.J., Drucker, J.A., Seeff, L.B., Hoofnagle, J.H., Jackson, D.R., April, M., Barker, L.F., and Pineda-Tamondong, G. (1978). Transmission of non-A, non-B hepatitis from man to chimpanzee. *Lancet* *1*, 463–466.
 - Takahashi, K., Asabe, S., Wieland, S., Garaigorta, U., Gastaminza, P., Isogawa, M., and Chisari, F.V. (2010). Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virus-infected cells, produce interferon, and inhibit infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 7431–7436.
 - Takashita, E., Morita, H., Ogawa, R., Nakamura, K., Fujisaki, S., Shirakura, M., Kuwahara, T., Kishida, N., Watanabe, S., and Odagiri, T. (2018). Susceptibility of Influenza Viruses to the Novel Cap-Dependent Endonuclease Inhibitor Baloxavir Marboxil. *Front Microbiol* *9*, 3026.
 - Tan, W.S., Dyson, M.R., and Murray, K. (1999). Two distinct segments of the hepatitis B virus surface antigen contribute synergistically to its association with the viral core particles. Edited by J. Karn. *Journal of Molecular Biology* *286*, 797–808.
 - Tanaka, T., Kuroda, K., Ikeda, M., Wakita, T., Kato, N., and Makishima, M. (2013). Hepatitis C virus NS4B targets lipid droplets through hydrophobic residues in the amphipathic helices. *J. Lipid Res.* *54*, 881–892.
 - Tavis, J.E., and Ganem, D. (1996). Evidence for activation of the hepatitis B virus polymerase by binding of its RNA template. *J Virol* *70*, 5741–5750.
 - Tavis, J.E., Perri, S., and Ganem, D. (1994). Hepadnavirus reverse transcription initiates within the stem-loop of the RNA packaging signal and employs a novel strand transfer. *J. Virol.* *68*, 3536–3543.
 - Tellinghuisen, T.L., Marcotrigiano, J., and Rice, C.M. (2005). Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* *435*, 374–379.
 - Tellinghuisen, T.L., Foss, K.L., Treadaway, J.C., and Rice, C.M. (2008a). Identification of residues required for RNA replication in domains II and III of the hepatitis C virus NS5A protein. *J. Virol.* *82*, 1073–1083.
 - Tellinghuisen, T.L., Foss, K.L., and Treadaway, J. (2008b). Regulation of Hepatitis C Virion Production via Phosphorylation of the NS5A Protein. *PLOS Pathogens* *4*, e1000032.
 - Tenney, D.J., Rose, R.E., Baldick, C.J., Pokornowski, K.A., Eggers, B.J., Fang, J., Wichroski, M.J., Xu, D., Yang, J., Wilber, R.B., et al. (2009). Long-term monitoring shows hepatitis B virus resistance to entecavir in nucleoside-naïve patients is rare through 5 years of therapy. *Hepatology* *49*, 1503–1514.
 - Terenin, I.M., Dmitriev, S.E., Andreev, D.E., and Shatsky, I.N. (2008). Eukaryotic

- translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *15*, 836–841.
- Thimme, R., Oldach, D., Chang, K.-M., Steiger, C., Ray, S.C., and Chisari, F.V. (2001). Determinants of Viral Clearance and Persistence during Acute Hepatitis C Virus Infection. *J Exp Med* *194*, 1395–1406.
 - Thimme, R., Bukh, J., Spangenberg, H.C., Wieland, S., Pemberton, J., Steiger, C., Govindarajan, S., Purcell, R.H., and Chisari, F.V. (2002). Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *PNAS* *99*, 15661–15668.
 - Thompson, M.R., Kaminski, J.J., Kurt-Jones, E.A., and Fitzgerald, K.A. (2011). Pattern Recognition Receptors and the Innate Immune Response to Viral Infection. *Viruses* *3*, 920–940.
 - Thomson, S., Clayton, A.L., Hazzalin, C.A., Rose, S., Barratt, M.J., and Mahadevan, L.C. (1999a). The nucleosomal response associated with immediate-early gene induction is mediated via alternative MAP kinase cascades: MSK1 as a potential histone H3/HMG-14 kinase. *The EMBO Journal* *18*, 4779–4793.
 - Thomson, S., Mahadevan, L.C., and Clayton, A.L. (1999b). MAP kinase-mediated signalling to nucleosomes and immediate-early gene induction. *Seminars in Cell & Developmental Biology* *10*, 205–214.
 - Thomson, S., Clayton, A.L., and Mahadevan, L.C. (2001). Independent Dynamic Regulation of Histone Phosphorylation and Acetylation during Immediate-Early Gene Induction. *Molecular Cell* *8*, 1231–1241.
 - Thorens, B. (2015). GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia* *58*, 221–232.
 - Tong, Y., Chi, X., Yang, W., and Zhong, J. (2017). Functional Analysis of Hepatitis C Virus (HCV) Envelope Protein E1 Using a trans-Complementation System Reveals a Dual Role of a Putative Fusion Peptide of E1 in both HCV Entry and Morphogenesis. *Journal of Virology* *91*.
 - Tong, Y., Lavillette, D., Li, Q., and Zhong, J. (2018). Role of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E1 in Virus Entry and Assembly. *Front. Immunol.* *9*.
 - Toroney, R., Nallagatla, S.R., Boyer, J.A., Cameron, C.E., and Bevilacqua, P.C. (2010). Regulation of PKR by HCV IRES RNA: importance of domain II and NS5A. *J. Mol. Biol.* *400*, 393–412.
 - Trepo, C. (2014). A brief history of hepatitis milestones. *Liver International* *34*, 29–37.

Bibliographie

- Tscherne, D.M., Jones, C.T., Evans, M.J., Lindenbach, B.D., McKeating, J.A., and Rice, C.M. (2006). Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *J. Virol.* *80*, 1734–1741.
- Tseng, C.-T.K., and Klimpel, G.R. (2002). Binding of the Hepatitis C Virus Envelope Protein E2 to CD81 Inhibits Natural Killer Cell Functions. *J Exp Med* *195*, 43–50.
- Tu, T., Budzinska, M.A., Shackel, N.A., and Urban, S. (2017). HBV DNA Integration: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Viruses* *9*.
- Tuttleman, J.S., Pourcel, C., and Summers, J. (1986). Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell* *47*, 451–460.
- Uddin, S., Majchrzak, B., Woodson, J., Arunkumar, P., Alsayed, Y., Pine, R., Young, P.R., Fish, E.N., and Plataniias, L.C. (1999). Activation of the p38 Mitogen-activated Protein Kinase by Type I Interferons. *J. Biol. Chem.* *274*, 30127–30131.
- Uddin, S., Lekmine, F., Sharma, N., Majchrzak, B., Mayer, I., Young, P.R., Bokoch, G.M., Fish, E.N., and Plataniias, L.C. (2000). The Rac1/p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Is Required for Interferon α -dependent Transcriptional Activation but Not Serine Phosphorylation of Stat Proteins. *J. Biol. Chem.* *275*, 27634–27640.
- Uddin, S., Sassano, A., Deb, D.K., Verma, A., Majchrzak, B., Rahman, A., Malik, A.B., Fish, E.N., and Plataniias, L.C. (2002). Protein kinase C-delta (PKC-delta) is activated by type I interferons and mediates phosphorylation of Stat1 on serine 727. *J. Biol. Chem.* *277*, 14408–14416.
- Ullah, H., Hou, W., Dakshanamurthy, S., and Tang, Q. (2019). Host targeted antiviral (HTA): functional inhibitor compounds of scaffold protein RACK1 inhibit herpes simplex virus proliferation. *Oncotarget* *10*, 3209–3226.
- Ungureanu, D., Vanhatupa, S., Grönholm, J., Palvimo, J.J., and Silvennoinen, O. (2005). SUMO-1 conjugation selectively modulates STAT1-mediated gene responses. *Blood* *106*, 224–226.
- Urbani, S., Amadei, B., Tola, D., Massari, M., Schivazappa, S., Missale, G., and Ferrari, C. (2006). PD-1 Expression in Acute Hepatitis C Virus (HCV) Infection Is Associated with HCV-Specific CD8 Exhaustion. *Journal of Virology* *80*, 11398–11403.
- Usacheva, A., Smith, R., Minshall, R., Baida, G., Seng, S., Croze, E., and Colamonici, O. (2001). The WD motif-containing protein receptor for activated protein kinase C (RACK1) is required for recruitment and activation of signal transducer and activator of transcription 1 through the type I interferon receptor. *J. Biol. Chem.* *276*, 22948–22953.
- Utzschneider, D.T., Charmoy, M., Chennupati, V., Pousse, L., Ferreira, D.P., Calderon-

Bibliographie

- Copete, S., Danilo, M., Alfei, F., Hofmann, M., Wieland, D., et al. (2016). T Cell Factor 1-Expressing Memory-like CD8(+) T Cells Sustain the Immune Response to Chronic Viral Infections. *Immunity* 45, 415–427.
- Vaccination Info Service Hépatite B.
 - Vanni, E., Bugianesi, E., and Saracco, G. (2016). Treatment of type 2 diabetes mellitus by viral eradication in chronic hepatitis C: Myth or reality? *Dig Liver Dis* 48, 105–111.
 - Vazquez, C., Tan, C.Y., and Horner, S.M. (2019). Hepatitis C Virus Infection Is Inhibited by a Noncanonical Antiviral Signaling Pathway Targeted by NS3-NS4A. *Journal of Virology* 93.
 - Velazquez, V.M., Hon, H., Ibegbu, C., Knechtle, S.J., Kirk, A.D., and Grakoui, A. (2012). Hepatic enrichment and activation of myeloid dendritic cells during chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 56, 2071–2081.
 - Verrier, E.R., Colpitts, C.C., Bach, C., Heydmann, L., Weiss, A., Renaud, M., Durand, S.C., Habersetzer, F., Durantel, D., Abou-Jaoudé, G., et al. (2016a). A targeted functional RNA interference screen uncovers glypican 5 as an entry factor for hepatitis B and D viruses. *Hepatology* 63, 35–48.
 - Verrier, E.R., Colpitts, C.C., Schuster, C., Zeisel, M.B., and Baumert, T.F. (2016b). Cell Culture Models for the Investigation of Hepatitis B and D Virus Infection. *Viruses* 8.
 - Verrier, E.R., Yim, S.-A., Heydmann, L., El Saghire, H., Bach, C., Turon-Lagot, V., Mailly, L., Durand, S.C., Lucifora, J., Durantel, D., et al. (2018). Hepatitis B Virus Evasion From Cyclic Guanosine Monophosphate-Adenosine Monophosphate Synthase Sensing in Human Hepatocytes. *Hepatology* 68, 1695–1709.
 - Verrier, E.R., Weiss, A., Bach, C., Heydmann, L., Turon-Lagot, V., Kopp, A., El Saghire, H., Crouchet, E., Pessaux, P., Garcia, T., et al. (2020). Combined small molecule and loss-of-function screen uncovers estrogen receptor alpha and CAD as host factors for HDV infection and antiviral targets. *Gut* 69, 158–167.
 - Vilcek, J. (2003). Novel interferons. *Nature Immunology* 4, 8–9.
 - Visvanathan, K., Skinner, N.A., Thompson, A.J.V., Riordan, S.M., Sozzi, V., Edwards, R., Rodgers, S., Kurtovic, J., Chang, J., Lewin, S., et al. (2007). Regulation of Toll-like receptor-2 expression in chronic hepatitis B by the precore protein. *Hepatology* 45, 102–110.
 - Vogt, D.A., Camus, G., Herker, E., Webster, B.R., Tsou, C.-L., Greene, W.C., Yen, T.-S.B., and Ott, M. (2013). Lipid droplet-binding protein TIP47 regulates hepatitis C Virus RNA replication through interaction with the viral NS5A protein. *PLoS Pathog.* 9, e1003302.

Bibliographie

- Voorhees, R.M., Fernández, I.S., Scheres, S.H.W., and Hegde, R.S. (2014). Structure of the Mammalian Ribosome-Sec61 Complex to 3.4 Å Resolution. *Cell* 157, 1632–1643.
- Wagoner, J., Austin, M., Green, J., Imaizumi, T., Casola, A., Brasier, A., Khabar, K.S.A., Wakita, T., Gale, M., and Polyak, S.J. (2007). Regulation of CXCL-8 (interleukin-8) induction by double-stranded RNA signaling pathways during hepatitis C virus infection. *J. Virol.* 81, 309–318.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Kräusslich, H.-G., Mizokami, M., et al. (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* 11, 791–796.
- Wang, G.H., and Seeger, C. (1992). The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis. *Cell* 71, 663–670.
- Wang, G.H., and Seeger, C. (1993). Novel mechanism for reverse transcription in hepatitis B viruses. *J. Virol.* 67, 6507–6512.
- Wang, C., Le, S.Y., Ali, N., and Siddiqui, A. (1995). An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5' noncoding region. *RNA* 1, 526–537.
- Wang, H., Perry, J.W., Lauring, A.S., Neddermann, P., De Francesco, R., and Tai, A.W. (2014). Oxysterol-binding protein is a phosphatidylinositol 4-kinase effector required for HCV replication membrane integrity and cholesterol trafficking. *Gastroenterology* 146, 1373-1385.e1-11.
- Wang, L., Wang, Y., Ye, D., and Liu, Q. (2020). Review of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) based on current evidence. *International Journal of Antimicrobial Agents* 55, 105948.
- Wang, N., Liang, Y., Devaraj, S., Wang, J., Lemon, S.M., and Li, K. (2009). Toll-Like Receptor 3 Mediates Establishment of an Antiviral State against Hepatitis C Virus in Hepatoma Cells. *Journal of Virology* 83, 9824–9834.
- Wang, W., Xu, L., Brandsma, J.H., Wang, Y., Hakim, M.S., Zhou, X., Yin, Y., Fuhler, G.M., van der Laan, L.J.W., van der Woude, C.J., et al. (2016). Convergent Transcription of Interferon-stimulated Genes by TNF- α and IFN- α Augments Antiviral Activity against HCV and HEV. *Scientific Reports* 6, 1–14.
- Wang, W., Xu, L., Su, J., Peppelenbosch, M.P., and Pan, Q. (2017). Transcriptional Regulation of Antiviral Interferon-Stimulated Genes. *Trends in Microbiology* 25, 573–584.
- Wang, W.-D., Wen, Z., Ji, W., and Ma, Y. (2015). RACK1 expression contributes to JNK activity, but JNK activity does not enhance RACK1 expression in hepatocellular carcinoma

- SMMC-7721 cells. *Oncology Letters* 9, 2767–2770.
- Wang, Z., Wang, M., and Carr, B.I. (2008). Integrin $\alpha 5$ -induced EGFR activation by prothrombin triggers hepatocyte apoptosis via the JNK signaling pathway. *Journal of Cellular Physiology* 216, 551–557.
 - Ward, H., Tang, L., Poonia, B., and Kottilil, S. (2016). Treatment of hepatitis B virus: an update. *Future Microbiol* 11, 1581–1597.
 - Watanabe, T., Watanabe, S., and Kawaoka, Y. (2010). Cellular networks involved in the influenza virus life cycle. *Cell Host Microbe* 7, 427–439.
 - Watanabe, T., Hiasa, Y., Tokumoto, Y., Hirooka, M., Abe, M., Ikeda, Y., Matsuura, B., Chung, R.T., and Onji, M. (2013). Protein kinase R modulates c-Fos and c-Jun signaling to promote proliferation of hepatocellular carcinoma with hepatitis C virus infection. *PLoS ONE* 8, e67750.
 - Watanabe, T., Kawakami, E., Shoemaker, J.E., Lopes, T.J.S., Matsuoka, Y., Tomita, Y., Kozuka-Hata, H., Gorai, T., Kuwahara, T., Takeda, E., et al. (2014). Influenza virus-host interactome screen as a platform for antiviral drug development. *Cell Host Microbe* 16, 795–805.
 - Wathelet, M.G., Lin, C.H., Parekh, B.S., Ronco, L.V., Howley, P.M., and Maniatis, T. (1998). Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo. *Mol. Cell* 1, 507–518.
 - Watterson, D., Modhiran, N., and Young, P.R. (2016). The many faces of the flavivirus NS1 protein offer a multitude of options for inhibitor design. *Antiviral Res.* 130, 7–18.
 - Webster, G.J., Reignat, S., Maini, M.K., Whalley, S.A., Ogg, G.S., King, A., Brown, D., Amlot, P.L., Williams, R., Vergani, D., et al. (2000). Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanisms. *Hepatology* 32, 1117–1124.
 - Weihua, X., Hu, J., Roy, S.K., Mannino, S.B., and Kalvakolanu, D.V. (2000). Interleukin-6 modulates interferon-regulated gene expression by inducing the ISGF3 γ gene using CCAAT/enhancer binding protein-beta (C/EBP- β). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1492, 163–171.
 - Weinlich, S., Hüttelmaier, S., Schierhorn, A., Behrens, S.-E., Ostareck-Lederer, A., and Ostareck, D.H. (2009). IGF2BP1 enhances HCV IRES-mediated translation initiation via the 3'UTR. *RNA* 15, 1528–1542.
 - Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C.K.E., Walther, P., Fuller, S.D., Antony, C., Krijnse-Locker, J., and Bartenschlager, R. (2009). Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host*

- & *Microbe* 5, 365–375.
- Wen, C., He, X., Ma, H., Hou, N., Wei, C., Song, T., Zhang, Y., Sun, L., Ma, Q., and Zhong, H. (2008a). Hepatitis C Virus Infection Downregulates the Ligands of the Activating Receptor NKG2D. *Cellular & Molecular Immunology* 5, 475–478.
 - Wen, Y., Golubkov, V.S., Strongin, A.Y., Jiang, W., and Reed, J.C. (2008b). Interaction of hepatitis B viral oncoprotein with cellular target HBXIP dysregulates centrosome dynamics and mitotic spindle formation. *J. Biol. Chem.* 283, 2793–2803.
 - Werr, M., and Prange, R. (1998). Role for calnexin and N-linked glycosylation in the assembly and secretion of hepatitis B virus middle envelope protein particles. *J. Virol.* 72, 778–782.
 - Wieland, D., Kemming, J., Schuch, A., Emmerich, F., Knolle, P., Neumann-Haefelin, C., Held, W., Zehn, D., Hofmann, M., and Thimme, R. (2017). TCF1 + hepatitis C virus-specific CD8 + T cells are maintained after cessation of chronic antigen stimulation. *Nature Communications* 8, 1–13.
 - Wieland, S., Thimme, R., Purcell, R.H., and Chisari, F.V. (2004). Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 6669–6674.
 - Wiesen, E., Diorditsa, S., and Li, X. (2016). Progress towards hepatitis B prevention through vaccination in the Western Pacific, 1990-2014. *Vaccine* 34, 2855–2862.
 - Will, H., Reiser, W., Weimer, T., Pfaff, E., Büscher, M., Sprengel, R., Cattaneo, R., and Schaller, H. (1987). Replication strategy of human hepatitis B virus. *J. Virol.* 61, 904–911.
 - Wilson, G.K., Tennant, D.A., and McKeating, J.A. (2014). Hypoxia inducible factors in liver disease and hepatocellular carcinoma: Current understanding and future directions. *Journal of Hepatology* 61, 1397–1406.
 - Wodrich, H., and Kräusslich, H.G. (2001). Nucleocytoplasmic RNA transport in retroviral replication. *Results Probl Cell Differ* 34, 197–217.
 - Wolski, D., Foote, P.K., Chen, D.Y., Lewis-Ximenez, L.L., Fauvelle, C., Aneja, J., Walker, A., Tonnerre, P., Torres-Cornejo, A., Kvistad, D., et al. (2017). Early Transcriptional Divergence Marks Virus-Specific Primary Human CD8+ T Cells in Chronic versus Acute Infection. *Immunity* 47, 648-663.e8.
 - Woo, A.S.J., Kwok, R., and Ahmed, T. (2017). Alpha-interferon treatment in hepatitis B. *Ann Transl Med* 5.
 - Wrensch, F., Crouchet, E., Ligat, G., Zeisel, M.B., Keck, Z.-Y., Fong, S.K.H., Schuster, C., and Baumert, T.F. (2018). Hepatitis C Virus (HCV)–Apolipoprotein Interactions and Immune Evasion and Their Impact on HCV Vaccine Design. *Front. Immunol.* 9.

Bibliographie

- Wu, J., Meng, J., Du, Y., Huang, Y., Jin, Y., Zhang, J., Wang, B., Zhang, Y., Sun, M., and Tang, J. (2013). RACK1 promotes the proliferation, migration and invasion capacity of mouse hepatocellular carcinoma cell line in vitro probably by PI3K/Rac1 signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 67, 313–319.
- Wu, M., Xu, Y., Lin, S., Zhang, X., Xiang, L., and Yuan, Z. (2007). Hepatitis B virus polymerase inhibits the interferon-inducible MyD88 promoter by blocking nuclear translocation of Stat1. *J. Gen. Virol.* 88, 3260–3269.
- Wu, T.R., Hong, Y.K., Wang, X.-D., Ling, M.Y., Dragoi, A.M., Chung, A.S., Campbell, A.G., Han, Z.-Y., Feng, G.-S., and Chin, Y.E. (2002). SHP-2 Is a Dual-specificity Phosphatase Involved in Stat1 Dephosphorylation at Both Tyrosine and Serine Residues in Nuclei. *J. Biol. Chem.* 277, 47572–47580.
- Wu, T.-T., Coates, L., Aldrics, C.E., Summers, J., and Mason, W.S. (1990). In hepatocytes infected with duck hepatitis B virus, the template for viral RNA synthesis is amplified by an intracellular pathway. *Virology* 175, 255–261.
- Wynne, S.A., Crowther, R.A., and Leslie, A.G. (1999). The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. *Mol. Cell* 3, 771–780.
- Xia, Y., and Protzer, U. (2017). Control of Hepatitis B Virus by Cytokines. *Viruses* 9.
- Xia, Y., Stadler, D., Lucifora, J., Reisinger, F., Webb, D., Hösel, M., Michler, T., Wisskirchen, K., Cheng, X., Zhang, K., et al. (2016). Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α Produced by T Cells Reduce the HBV Persistence Form, cccDNA, Without Cytolysis. *Gastroenterology* 150, 194–205.
- Xie, Q., Shen, H.-C., Jia, N.-N., Wang, H., Lin, L.-Y., An, B.-Y., Gui, H.-L., Guo, S.-M., Cai, W., Yu, H., et al. (2009). Patients with chronic hepatitis B infection display deficiency of plasmacytoid dendritic cells with reduced expression of TLR9. *Microbes Infect.* 11, 515–523.
- Xie, T., Chen, T., Li, C., Wang, W., Cao, L., Rao, H., Yang, Q., Shu, H.-B., and Xu, L.-G. (2019). RACK1 attenuates RLR antiviral signaling by targeting VISA-TRAF complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 508, 667–674.
- Xu, C., and Min, J. (2011). Structure and function of WD40 domain proteins. *Protein Cell* 2, 202–214.
- Xu, L., Zhou, X., Wang, W., Wang, Y., Yin, Y., Laan, L.J.W. van der, Sprengers, D., Metselaar, H.J., Peppelenbosch, M.P., and Pan, Q. (2016). IFN regulatory factor 1 restricts hepatitis E virus replication by activating STAT1 to induce antiviral IFN-stimulated genes. *The FASEB Journal* 30, 3352–3367.

Bibliographie

- Xu, L.-G., Wang, Y.-Y., Han, K.-J., Li, L.-Y., Zhai, Z., and Shu, H.-B. (2005). VISA Is an Adapter Protein Required for Virus-Triggered IFN- β Signaling. *Molecular Cell* 19, 727–740.
- Xu, N., Yao, H.-P., Lv, G.-C., and Chen, Z. (2012). Downregulation of TLR7/9 leads to deficient production of IFN- α from plasmacytoid dendritic cells in chronic hepatitis B. *Inflamm. Res.* 61, 997–1004.
- Yan, H., Zhong, G., Xu, G., He, W., Jing, Z., Gao, Z., Huang, Y., Qi, Y., Peng, B., Wang, H., et al. (2012). Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* 1, e00049.
- Yan, Y., He, Y., Boson, B., Wang, X., Cosset, F.-L., and Zhong, J. (2017). A Point Mutation in the N-Terminal Amphipathic Helix $\alpha 0$ in NS3 Promotes Hepatitis C Virus Assembly by Altering Core Localization to the Endoplasmic Reticulum and Facilitating Virus Budding. *Journal of Virology* 91.
- Yang, W., and Summers, J. (1999). Integration of Hepadnavirus DNA in Infected Liver: Evidence for a Linear Precursor. *J Virol* 73, 9710–9717.
- Yang, W., Qiu, C., Biswas, N., Jin, J., Watkins, S.C., Montelaro, R.C., Coyne, C.B., and Wang, T. (2008). Correlation of the tight junction-like distribution of Claudin-1 to the cellular tropism of hepatitis C virus. *J. Biol. Chem.* 283, 8643–8653.
- Yao, F., Long, L.-Y., Deng, Y.-Z., Feng, Y.-Y., Ying, G.-Y., Bao, W.-D., Li, G., Guan, D.-X., Zhu, Y.-Q., Li, J.-J., et al. (2014). RACK1 modulates NF- κ B activation by interfering with the interaction between TRAF2 and the IKK complex. *Cell Res.* 24, 359–371.
- Yeung, M.L., Houzet, L., Yedavalli, V.S.R.K., and Jeang, K.-T. (2009). A genome-wide short hairpin RNA screening of jurkat T-cells for human proteins contributing to productive HIV-1 replication. *J. Biol. Chem.* 284, 19463–19473.
- Yi, G., Wen, Y., Shu, C., Han, Q., Konan, K.V., Li, P., and Kao, C.C. (2016). Hepatitis C Virus NS4B Can Suppress STING Accumulation To Evade Innate Immune Responses. *Journal of Virology* 90, 254–265.
- Yim, H.J., and Lok, A.S.-F. (2006). Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology* 43, S173-181.
- Yoneyama, M., Onomoto, K., Jogi, M., Akaboshi, T., and Fujita, T. (2015). Viral RNA detection by RIG-I-like receptors. *Current Opinion in Immunology* 32, 48–53.
- Yoo, Y.-G., Oh, S.H., Park, E.S., Cho, H., Lee, N., Park, H., Kim, D.K., Yu, D.-Y., Seong, J.K., and Lee, M.-O. (2003). Hepatitis B virus X protein enhances transcriptional activity of hypoxia-inducible factor-1alpha through activation of mitogen-activated protein kinase

- pathway. *J. Biol. Chem.* 278, 39076–39084.
- Yoon, J.C., Lim, J.-B., Park, J.H., and Lee, J.M. (2011). Cell-to-Cell Contact with Hepatitis C Virus-Infected Cells Reduces Functional Capacity of Natural Killer Cells. *Journal of Virology* 85, 12557–12569.
 - Yoshida, H., Kato, N., Shiratori, Y., Otsuka, M., Maeda, S., Kato, J., and Omata, M. (2001). Hepatitis C Virus Core Protein Activates Nuclear Factor κ B-dependent Signaling through Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor. *J. Biol. Chem.* 276, 16399–16405.
 - You, S., and Rice, C.M. (2008). 3' RNA elements in hepatitis C virus replication: kissing partners and long poly(U). *J. Virol.* 82, 184–195.
 - You, L.-R., Chen, C.-M., and Lee, Y.-H.W. (1999). Hepatitis C Virus Core Protein Enhances NF- κ B Signal Pathway Triggering by Lymphotoxin- β Receptor Ligand and Tumor Necrosis Factor Alpha. *Journal of Virology* 73, 1672–1681.
 - You, S., Stump, D.D., Branch, A.D., and Rice, C.M. (2004). A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* 78, 1352–1366.
 - Yu, C.-Y., Chang, T.-H., Liang, J.-J., Chiang, R.-L., Lee, Y.-L., Liao, C.-L., and Lin, Y.-L. (2012a). Dengue Virus Targets the Adaptor Protein MITA to Subvert Host Innate Immunity. *PLoS Pathog* 8.
 - Yu, G.-Y., He, G., Li, C.-Y., Tang, M., Grivennikov, S., Tsai, W.-T., Wu, M.-S., Hsu, C.-W., Tsai, Y., Wang, L.H.-C., et al. (2012b). Hepatic expression of HCV RNA-dependent RNA polymerase triggers innate immune signaling and cytokine production. *Mol. Cell* 48, 313–321.
 - Yu, Y., Wang, R., Nan, Y., Zhang, L., and Zhang, Y. (2013). Induction of STAT1 phosphorylation at serine 727 and expression of proinflammatory cytokines by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *PLoS ONE* 8, e61967.
 - Yuan, H.-J., Ka-Ho Wong, D., Doutreloigne, J., Sablon, E., Lai, C.-L., and Yuen, M.-F. (2007). Precore and core promoter mutations at the time of HBeAg seroclearance in Chinese patients with chronic hepatitis B. *J. Infect.* 54, 497–503.
 - Yuhashi, K., Ohnishi, S., Kodama, T., Koike, K., and Kanamori, H. (2014). In vitro selection of the 3'-untranslated regions of the human liver mRNA that bind to the HCV nonstructural protein 5B. *Virology* 450–451, 13–23.
 - Zeisel, M.B., Koutsoudakis, G., Schnober, E.K., Haberstroh, A., Blum, H.E., Cosset, F.-L., Wakita, T., Jaeck, D., Doffoel, M., Royer, C., et al. (2007). Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked

- to CD81. *Hepatology* 46, 1722–1731.
- Zeuzem, S., Dusheiko, G.M., Salupere, R., Mangia, A., Flisiak, R., Hyland, R.H., Illeperuma, A., Svarovskaia, E., Brainard, D.M., Symonds, W.T., et al. (2014). Sofosbuvir and Ribavirin in HCV Genotypes 2 and 3. *New England Journal of Medicine* 370, 1993–2001.
 - Zhang, J., Zhu, F., Li, X., Dong, Z., Xu, Y., Peng, C., Li, S., Cho, Y.-Y., Yao, K., Zykova, T.A., et al. (2012). Rack1 protects N-terminal phosphorylated c-Jun from Fbw7-mediated degradation. *Oncogene* 31, 1835–1844.
 - Zhang, W., Zong, C.S., Hermanto, U., Lopez-Bergami, P., Ronai, Z., and Wang, L.-H. (2006). RACK1 Recruits STAT3 Specifically to Insulin and Insulin-Like Growth Factor 1 Receptors for Activation, Which Is Important for Regulating Anchorage-Independent Growth. *Molecular and Cellular Biology* 26, 413–424.
 - Zhang, Z., Sun, E., Ou, J.J., and Liang, T.J. (2010). Inhibition of Cellular Proteasome Activities Mediates HBX-Independent Hepatitis B Virus Replication In Vivo. *J Virol* 84, 9326–9331.
 - Zhao, L.-H., Liu, X., Yan, H.-X., Li, W.-Y., Zeng, X., Yang, Y., Zhao, J., Liu, S.-P., Zhuang, X.-H., Lin, C., et al. (2016). Genomic and oncogenic preference of HBV integration in hepatocellular carcinoma. *Nature Communications* 7, 12992.
 - Zhao, Y., Wang, Q., Qiu, G., Zhou, S., Jing, Z., Wang, J., Wang, W., Cao, J., Han, K., Cheng, Q., et al. (2015). RACK1 Promotes Autophagy by Enhancing the Atg14L-Beclin 1-Vps34-Vps15 Complex Formation upon Phosphorylation by AMPK. *Cell Reports* 13, 1407–1417.
 - Zhong, B., Yang, Y., Li, S., Wang, Y.-Y., Li, Y., Diao, F., Lei, C., He, X., Zhang, L., Tien, P., et al. (2008). The Adaptor Protein MITA Links Virus-Sensing Receptors to IRF3 Transcription Factor Activation. *Immunity* 29, 538–550.
 - Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D.R., Wieland, S.F., Uprichard, S.L., Wakita, T., and Chisari, F.V. (2005). Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 9294–9299.
 - Zhong, W., Uss, A.S., Ferrari, E., Lau, J.Y., and Hong, Z. (2000). De novo initiation of RNA synthesis by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase. *J. Virol.* 74, 2017–2022.
 - Zhou, H., Xu, M., Huang, Q., Gates, A.T., Zhang, X.D., Castle, J.C., Stec, E., Ferrer, M., Strulovici, B., Hazuda, D.J., et al. (2008). Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication. *Cell Host Microbe* 4, 495–504.

Bibliographie

- Zhou, T., Ren, X., Adams, R.L., and Pyle, A.M. (2018). NS3 from Hepatitis C Virus Strain JFH-1 Is an Unusually Robust Helicase That Is Primed To Bind and Unwind Viral RNA. *J. Virol.* 92.
- Zhu, H., Dong, H., Eksioglu, E., Hemming, A., Cao, M., Crawford, J.M., Nelson, D.R., and Liu, C. (2007). Hepatitis C Virus Triggers Apoptosis of a Newly Developed Hepatoma Cell Line Through Antiviral Defense System. *Gastroenterology* 133, 1649–1659.
- Zona, L., Lupberger, J., Sidahmed-Adrar, N., Thumann, C., Harris, H.J., Barnes, A., Florentin, J., Tawar, R.G., Xiao, F., Turek, M., et al. (2013). HRas signal transduction promotes hepatitis C virus cell entry by triggering assembly of the host tetraspanin receptor complex. *Cell Host Microbe* 13, 302–313.
- van Zonneveld, M., Honkoop, P., Hansen, B.E., Niesters, H.G.M., Darwish Murad, S., de Man, R.A., Schalm, S.W., and Janssen, H.L.A. (2004). Long-term follow-up of alpha-interferon treatment of patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 39, 804–810.
- Zoulim, F., and Seeger, C. (1994). Reverse transcription in hepatitis B viruses is primed by a tyrosine residue of the polymerase. *J. Virol.* 68, 6–13.
- Zumla, A.I., and Memish, Z.A. (2014). Middle East respiratory syndrome coronavirus: epidemic potential or a storm in a teacup? *European Respiratory Journal* 43, 1243–1248.

**Annexe 1 : Verrier *et al.*,
Hepatology, 2018**

Hepatitis B Virus Evasion From Cyclic Guanosine Monophosphate–Adenosine Monophosphate Synthase Sensing in Human Hepatocytes

Eloi R. Verrier,^{1*} Seung-Ae Yim,^{1*} Laura Heydmann,¹ Houssein El Saghire,¹ Charlotte Bach,¹ Vincent Turon-Lagot,¹ Laurent Maïlly,¹ Sarah C. Durand,¹ Julie Lucifora,² David Durantel,² Patrick Pessaux,^{1,3} Nicolas Manel,^{4,5} Ivan Hirsch,⁶ Mirjam B. Zeisel,¹ Nathalie Pochet,⁷ Catherine Schuster,^{1*} and Thomas F. Baumert^{1,3*}

Chronic hepatitis B virus (HBV) infection is a major cause of chronic liver disease and cancer worldwide. The mechanisms of viral genome sensing and the evasion of innate immune responses by HBV infection are still poorly understood. Recently, the cyclic guanosine monophosphate–adenosine monophosphate synthase (cGAS) was identified as a DNA sensor. In this study, we investigated the functional role of cGAS in sensing HBV infection and elucidate the mechanisms of viral evasion. We performed functional studies including loss-of-function and gain-of-function experiments combined with cGAS effector gene expression profiling in an infectious cell culture model, primary human hepatocytes, and HBV-infected human liver chimeric mice. Here, we show that cGAS is expressed in the human liver, primary human hepatocytes, and human liver chimeric mice. While naked relaxed-circular HBV DNA is sensed in a cGAS-dependent manner in hepatoma cell lines and primary human hepatocytes, host cell recognition of viral nucleic acids is abolished during HBV infection, suggesting escape from sensing, likely during packaging of the genome into the viral capsid. While the hepatocyte cGAS pathway is functionally active, as shown by reduction of viral covalently closed circular DNA levels in gain-of-function studies, HBV infection suppressed cGAS expression and function in cell culture models and humanized mice. **Conclusion:** HBV exploits multiple strategies to evade sensing and antiviral activity of cGAS and its effector pathways. (HEPATOLOGY 2018; 68:1695–1709).

With more than 250 million chronically infected patients, hepatitis B virus (HBV) infection is a leading cause of liver disease and hepatocellular carcinoma.^(1,2) Current antiviral therapies effectively control viral load but largely fail to cure.⁽³⁾ HBV is a partially double-stranded DNA (dsDNA) virus infecting human hepatocytes after initial attachment to heparan sulfate proteoglycans and its

receptor Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP; reviewed in Verrier et al.⁽⁴⁾). Following uncoating, the viral nucleocapsid is released into the cytoplasm. The viral genome is imported into the nucleus through mechanisms which are still poorly understood. The viral genome is converted in the nucleus into a covalently closed circular DNA (cccDNA).⁽⁵⁾ This minichromosome serves as a template

Abbreviations: Cas9, CRISPR-associated 9; cccDNA, covalently closed circular DNA; cDNA, complementary DNA; cGAMP, cyclic guanosine monophosphate–adenosine monophosphate; cGAS, cyclic guanosine monophosphate–adenosine monophosphate synthase; CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeats; DIG, digoxigenin; dsDNA, double-stranded DNA; FDR, false discovery rate; FISH, fluorescence in situ hybridization; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GSEA, gene set enrichment analysis; HBsAg, hepatitis B surface antigen; HBV, hepatitis B virus; HIV, human immunodeficiency virus; IAR, innate antiviral response gene set; IFI16, IFN- γ -inducible protein 16; IFN, interferon; IFNB1, IFN beta 1; IFNL1, IFN lambda 1; ISG, IFN-stimulated gene; KO, knockout; MB21D1, Mab-21 domain-containing protein 1; MOI, multiplicity of infection; NTCP, Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide; ORF, open reading frame; PEG, polyethylene glycol; pgRNA, pregenomic RNA; PHH, primary human hepatocyte; poly(I:C), polyinosinic:polycytidylic acid; rcDNA, relaxed circular DNA; SeV, Sendai virus; sgRNA, single-guide RNA; siRNA, small interfering RNA; STING, stimulator of IFN genes; TBK1, TANK binding kinase 1; TMEM173, transmembrane protein 173; uPA/SCID-bg, urokinase-type plasminogen activator/severe combined immunodeficient beige.

Received December 14, 2017; accepted April 18, 2018.

Additional Supporting Information may be found at onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.30054/supinfo.

for both pregenomic RNA (pgRNA) and viral mRNA transcription. While recent studies have suggested sensing of the pgRNA or other HBV RNAs by either MDA5⁽⁶⁾ or RIG-I,⁽⁷⁾ the recognition of the viral nucleic acids by the regular pattern recognition receptors remains elusive. In general, HBV does not or does only marginally activate innate immune responses in cell culture models and *in vivo*,⁽⁸⁻¹⁴⁾ leading to the concept that HBV behaves like a “stealth” virus avoiding viral DNA and RNA sensing.⁽¹⁵⁾ Other studies have suggested an active inhibition of the innate immune responses by HBV proteins.⁽¹⁶⁾ Consequently, the interaction of HBV and the innate immune system of hepatocytes, and in particular the sensing of HBV DNA, is only poorly understood.

Foreign DNA recognition by cytosolic DNA sensors triggers an early antiviral innate immune response, including type I and type III interferon (IFN) production.⁽¹⁷⁾ Recently, the cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate (cGAMP) synthase (cGAS) was identified as a DNA sensor exhibiting antiviral activity against a broad range of DNA and RNA viruses.⁽¹⁸⁻²⁰⁾ cGAS is encoded by the Mab-21 domain-

containing protein 1 (*MB21D1*) gene and directly binds to dsDNAs, inducing the production of cGAMP, which is recognized by the stimulator of IFN genes (STING, encoded by transmembrane protein 173 [*TMEM173*]), triggering the expression of IFN-stimulated genes (ISGs) through TANK binding kinase 1 (TBK1) activation.⁽²¹⁻²³⁾ While two studies have investigated cGAS–HBV interactions in viral replication and assembly,^(24,25) the functional role of cGAS in sensing of the viral genome during natural infection of human hepatocytes remains unknown.

The understanding of HBV–host interactions, including the innate immune response after infection, has been hampered for a long time by the absence of a robust cell culture model system for the study of viral infection.⁽²⁶⁾ The development of HBV-susceptible NTCP-overexpressing hepatoma cells, such as HepG2-NTCP cells, allows the study of the full life cycle in a robust and easy-to-use cell culture model.⁽²⁶⁾ HepG2 cells are capable of mounting an efficient innate immune response after infection by hepatitis C virus.⁽²⁷⁾ Moreover, another study took advantage of HBV-infected HepG2-NTCP for studying the interaction

*These authors contributed equally to this work, as first authors.

**These authors contributed equally to this work, as senior authors

Supported by the European Union (ERC-AdG-2014-671231-HEPCIR, EU H2020-667273-HEPCAR, EU-InfectEra HepBccc), the National Institutes of Health (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 1R03AI131066-01A1 and U19AI123862; National Cancer Institute, R21 CA209940), the Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les Hépatites Virales (ANRS, 2015/1099), the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (TheraHCC IHUARC IHU201301187, GACR 17-15422S), and a PhD fellowship of the Région Alsace, France. The work has been published under the framework of the LABEX ANR-10-LABX-0028_HEPSYS and benefits from funding from the state managed by the French National Research Agency as part of the Investments for the Future program. E.R.V. was supported by a fellowship from the ANRS (ECTZ50121).

© 2018 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

View this article online at wileyonlinelibrary.com.

DOI 10.1002/hep.30054

Potential conflict of interest: Dr. Pessaux consults for Integra and Merck. He owns stock in Virtualisure.

ARTICLE INFORMATION:

From the ¹Université de Strasbourg, Inserm, Institut de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques UMRS_1110, Strasbourg, France; ²Inserm, U1052, Cancer Research Center of Lyon (CRCL), Université de Lyon (UCBL1), CNRS UMR_5286, Centre Léon Bérard, Lyon, France; ³Pôle Hépatite-Digestif, Institut Hospitalo-Universitaire, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France; ⁴Immunity and Cancer Department, Institut Curie, PSL Research University, Paris, France; ⁵Inserm, U932, Paris, France; ⁶Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Science, Biocev, Charles University; Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, CAS, IOCB & Gilead Research Center, Prague, Czech Republic; ⁷Ann Romney Center for Neurologic Diseases, Department of Neurology, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA; Cell Circuits Program, Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA.

ADDRESS CORRESPONDENCE AND REPRINT REQUESTS TO:

Thomas F. Baumert, M.D., Catherine Schuster, Ph.D.,
or Eloi R. Verrier, Ph.D.
Inserm UMRS_1110, Institut de Recherche sur les Maladies Virales et
Hépatiques
3 Rue Koeberlé

67000 Strasbourg, France
E-mail: thomas.baumert@unistra.fr,
catherine.schuster@unistra.fr, or e.verrier@unistra.fr
Tel: +33-3-68-85-37-03

between RIG-I and HBV RNA,⁽⁷⁾ suggesting that this cell line is suitable for the study of the innate immune response after HBV infection. Here, we aimed to understand the functional role of cGAS for the HBV life cycle in human hepatocytes and unravel the mechanisms of viral evasion using loss-of-function and gain-of-function experiments combined with cGAS effector gene expression profiling in human liver chimeric mice.

Patients and Methods

HUMAN SUBJECTS

Human material including liver tissue from patients undergoing surgical resection or HBV-positive serum was obtained with informed consent from all patients. Protocols were approved by the Ethics Committee of the University of Strasbourg Hospitals, France (CPP 10-17 and DC-2016-2616).

ANIMAL EXPERIMENTATION

All mice were kept in a specific pathogen-free animal housing facility at Inserm UMRS_1110. The respective protocols were approved by the Ethics Committee of the University of Strasbourg Hospitals and authorized by the French Ministry of Research (nos. 02014120416254981AL/02/19/08/12, AL/01/18/08/1202014120416254981, 0201412051105 4408). Mice were kept in individual ventilated cages, with bedding composed of irradiated sawdust and chips from spruce and pine and enriched with cotton cocoon and aspen bricks. The animal diet consisted of 25 kGy irradiated RM3(E) (SDS) and mice were not fasted. Primary human hepatocytes (PHHs) were transplanted into 3-week-old urokinase-type plasminogen activator/severe combined immunodeficient beige (uPA/SCID-bg) mice (male and female) by intrasplenic injection as described.⁽²⁸⁾ Engraftment and viability of PHHs were assessed by quantification of human serum albumin by enzyme-linked immunosorbent assay (E80-129; Bethyl Laboratories).⁽²⁸⁾ uPA/SCID-bg mice were then infected with serum-derived HBV and sacrificed 16 weeks after virus inoculation. Serum HBV load was determined by quantitative PCR (Realtime HBV viral load kit; Abbott) before sacrifice. Interventions were all performed during light cycle.

CELL LINES AND HUMAN HEPATOCYTES

HEK 293T⁽²⁹⁾ and HepG2-NTCP⁽³⁰⁾ cells as well as isolation of PHHs have been described.⁽²⁹⁾

REAGENTS AND PLASMIDS

Dimethyl sulfoxide (DMSO), PEG 8000 (polyethylene glycol), polyinosinic:polycytidylic acid (poly [I:C]), and calf thymus DNA (control dsDNA) were obtained from Sigma-Aldrich; pReceiver-Lv151 plasmid was from GeneCopoeia; and lentiCas9-Blast and lentiGuide-Puro plasmids were gifts from Feng Zhang (Addgene 52962 and 52963).

SMALL INTERFERING RNAs FOR FUNCTIONAL STUDIES

Pools of ON-TARGET plus (Dharmacon) small interfering RNA (siRNA) targeting *MB21D1* (cGAS), *TMEM173* (STING), *TBK1*, and IFN- γ -inducible protein 16 (*IFI16*) expression were reverse-transfected into HepG2-NTCP using Lipofectamine RNAi-MAX (Invitrogen) as described.⁽²⁹⁾ RNA was purified from cells harvested 2 days after transfection, and gene expression was analyzed using quantitative RT-PCR.

HepG2-NTCP-cGAS OVEREXPRESSING AND *MB21D1* KNOCKOUT CELLS

Lentivirus particles were generated in HEK 293T cells by cotransfection of plasmids expressing the human immunodeficiency virus (HIV) gap-pol, the vesicular stomatitis virus glycoprotein, and either the human *MB21D1* full open reading frame (ORF) encoding plasmid, the *MB21D1*-targeting single-guide RNA (sgRNA) encoding plasmids, or the clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-associated 9 (Cas9) expressing plasmid, in a ratio of 10:3:10. HepG2-NTCP cells were then plated and transduced with lentivirus encoding either the human *MB21D1* ORF or the ORF of the gene for enhanced green fluorescent protein in pReceiver-Lv151 vector (GeneCopoeia) as a control. After 3 days, transduced cells were selected with 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of neomycin (G418). The cGAS-overexpressing and control HepG2-NTCP cells were then further cultured in the presence of G418 at 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. For the

generation of *MB21D1* knockout (KO) cell lines, one *MB21D1*-targeting sgRNA was designed using CRISPR Design Tool (Broad Institute, <http://www.genome-engineering.org/>). The sgRNA sequence targeting exon 1 of *MB21D1* (sgcGAS 5'-CACCGC GGCCCCATTCTCGTACGG-3') was inserted into lentiGuide-Puro plasmid.⁽³¹⁾ We first generated Cas9-expressing HepG2-NTCP cells after transduction of cells with the lentiCas9-Blast plasmid.⁽³¹⁾ Cells were then selected with 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ blasticidin for 10 days. HepG2-NTCP-Cas9 cells were seeded in six-well plates at 50% confluence 24 hours prior to transduction with the sgcGAS-encoding plasmid. Subpopulations of cells were selected from the whole population and cultured independently. cGAS expression was controlled by western blot. Finally, two cGAS-KO cell lines (cGAS_KO#1 and cGAS_KO#2) were selected.

ANALYSIS OF GENE EXPRESSION USING QUANTITATIVE RT-PCR

Total RNA was extracted using ReliaPrep RNA Miniprep Systems (Promega) and reverse-transcribed into complementary DNA (cDNA) using the Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. Gene expression was then quantified by quantitative PCR using a CFX96 thermocycler (Bio-Rad). Primers and TaqMan probes for *MB21D1* (cGAS), *TMEM173* (STING), *TBK1*, *IFI16*, IFN beta 1 (*IFNB1*), IFN lambda 1 (*IFNL1*), and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) mRNA detection were obtained from ThermoFisher (TaqMan Gene Expression Assay; Applied Biosystems). All values were normalized to *GAPDH* expression.

PROTEIN EXPRESSION

The expression of cGAS, STING, and β -actin proteins was assessed by western blot as described⁽³⁰⁾ using two polyclonal rabbit anti-cGAS antibodies (HPA031700, Sigma, and NBP1-86761, Novus Biologicals; see Supporting Information), a polyclonal rabbit anti-STING antibody (19851-1-AP; Proteintech), and a monoclonal anti- β -actin antibody (mAb-cam8226; Abcam). Protein expression was quantified using ImageJ software.

INFECTION OF HepG2-NTCP CELLS AND PHHs

The purification of infectious recombinant HBV particles from HepAD38 cells and infection of HepG2-NTCP cells have been described.⁽³⁰⁾ Briefly, HepG2-NTCP and derived cells were plated 1 day prior to incubation with HBV in the presence of 4% PEG at a multiplicity of infection (MOI) of ~ 500 GEq/cell except where otherwise stated. Sixteen hours after HBV inoculation, cells were washed with phosphate-buffered saline and then cultured in 3.5% DMSO primary hepatocyte maintenance medium for 10 days. HBV infection was assessed by quantification of HBV pgRNA using quantitative RT-PCR or HBV total DNA using quantitative PCR as described⁽³⁰⁾ or by immunofluorescence using anti-hepatitis B surface antigen (HBsAg) antibody (1044/329; Bio-Techne) and AF647-labeled goat antibody targeting mouse immunoglobulin Gs (115-605-003; Jackson Research) as described.⁽³⁰⁾ Southern blot detection of HBV cccDNA was performed using digoxigenin (DIG)-labeled (Roche) specific probes as described.⁽³²⁾ Total DNA from HBV-infected cells was extracted using the Hirt method as described.⁽³³⁾ Specific DIG-labeled probes for the detection of HBV and mitochondrial DNAs were synthesized using the PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche) and the primers indicated in Supporting Table S1. PHHs were plated 1 day prior to incubation with a HBV preS1 or a control peptide for 1 hour at 37°C as described.⁽³⁰⁾ PHHs were then infected with recombinant HBV particles for 10 days. HBV infection was assessed by quantification of HBV pgRNA using quantitative RT-PCR and immunofluorescence as described above.

SENDAI VIRUS INFECTION

HepG2-NTCP cells and PHHs were infected with Sendai virus (SeV) DI-H4 at an MOI of 10 as described.⁽¹³⁾

EXTRACTION OF HBV RELAXED CIRCULAR DNA FROM HBV INFECTIOUS PARTICLES

HBV relaxed circular DNA (rcDNA) was extracted from HBV preparations using the QiaAMP DNA MiniKit protocol (Qiagen). PEG-precipitated cell supernatants from naive HepG2-NTCP cells were used as nonviral controls. The presence of HBV

DNA was confirmed by PCR and quantified by quantitative PCR as described⁽³⁰⁾ (see Supporting Information). One microgram of rcDNA or dsDNA (calf thymus DNA) was transfected in cells using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) and the CalPhos Mammalian Transfection Kit (Clontech) according to the manufacturers' instructions. Cells transfected with HepG2-NTCP control supernatants were used as a control. Three days after transfection, total RNA was extracted and purified as described above.

TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS BY DIGITAL MULTIPLEXED GENE PROFILING USING nCOUNTER NanoString

Transcriptomic analyses using nCounter NanoString were performed according to the manufacturer's instructions. Specific probes for a set of 36 innate antiviral response-related (IAR) genes (according to Schoggins et al.⁽²⁰⁾ and additional genes listed in Supporting Table S2) were obtained from the manufacturer. HepG2-NTCP cells, HepG2-NTCP-derived cell lines, and PHHs either were infected with HBV or SeV or were transfected with poly(I:C) (100 ng) for 2 days. Alternatively, HepG2-NTCP-Cas9 and HepG2-NTCP-KO_cGAS#2 cells were transfected with rcDNA (1 μ g) or dsDNA (calf thymus DNA, 1 μ g) for 3 days. Total RNA was then extracted and subjected to the nCounter Digital Analyzer system (NanoString). Alternatively, total liver RNA was extracted from HBV-infected mice, and gene expression was assessed by either quantitative RT-PCR (*MB21D1* expression) or the nCounter Digital Analyzer system. The 36 genes were considered to be an artificial gene set, the IAR gene set. Its perturbation by infection, transfection, or gain-of-function/loss-of-function studies was assessed through gene set enrichment analysis (GSEA).⁽³⁴⁾ GSEA determines whether an *a priori* defined set of genes shows statistically significant differences between two biological states. A false discovery rate (FDR) < 0.05 was considered statistically significant. Heatmaps illustrating the induction (red) or repression (blue) of the genes of the IAR compared to control were illustrated using Morpheus software (Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA). Heatmaps illustrating the induction (red) or repression (blue) of individual genes in chimeric mouse livers were designed using GenePattern (Broad Institute of MIT and Harvard).

FLUORESCENCE *IN SITU* HYBRIDIZATION ANALYSES

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analyses were performed as described.^(28,35) Briefly, liver samples were collected from mice and then immediately embedded into optimal cutting temperature compound (OCT). OCT-embedded liver sections were cryosectioned (10 μ m) using a cryostat (Leica). Upon fixation with 4% formaldehyde at 4°C, washing, and dehydration in ethanol, tissue sections were boiled at 90°C–95°C for 1 minute in a pretreatment solution (Affymetrix-Panomics), followed by a 10-minute digestion in protease QF (Affymetrix-Panomics) at 40°C. Sections were then hybridized using specific probe sets targeting HBV (target region nucleotides 483–1473 of HBV [genotype D, GenBank V01460]) and human *MD21D1* (VA1-3013492-VC; Affymetrix-Panomics). Pre-amplification, amplification, and detection of bound probes were performed according to the manufacturer's instructions. Finally, pictures were acquired by confocal laser scanning microscopy (LSM710; Carl Zeiss Microscopy) and Zen2 software.

STATISTICAL ANALYSIS

Except where otherwise stated, cell culture experiments were performed at least 3 times in an independent manner. Statistical comparisons of the samples were performed using a two-tailed Mann-Whitney U test. For *in vivo* experiments, a two-tailed unpaired Student *t* test was performed for comparing gene expression from noninfected and HBV-infected mice. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001 were considered significant. Significant *P* values are indicated by asterisks in the figures. Each digital multiplexed gene profiling experiment was performed using three biological replicates per condition, and the induction or repression of the gene set was analyzed using GSEA. FDR < 0.05 was considered statistically significant.

Results

EXPRESSION OF cGAS IN PHHs AND AN INFECTIOUS HBV CELL CULTURE MODEL

Prior to its functional characterization, we studied cGAS/*MB21D1* expression in primary hepatocytes and HBV permissive cell lines. cGAS protein expression was easily detectable in PHHs from three

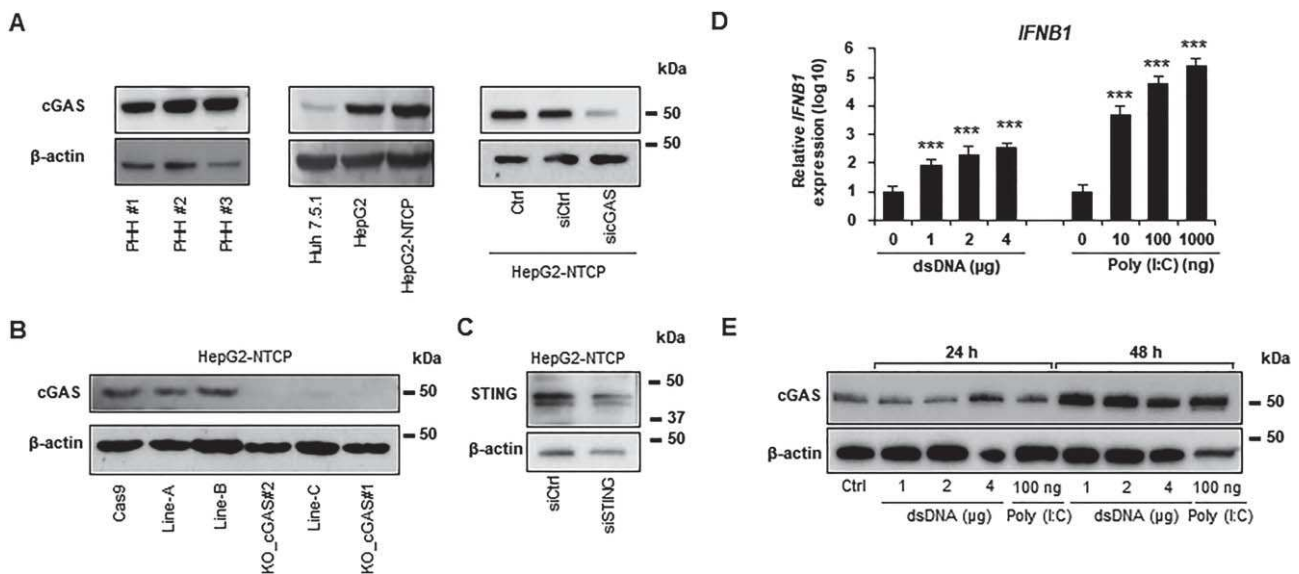


FIG. 1. cGAS expression and function in human hepatocytes and in a cell culture model for HBV infection. (A) Detection of endogenous cGAS protein expression in different cellular models by western blot. Cell lysates from PHHs from 3 independent donors, Huh7.5.1, HepG2, and HepG2-NTCP cells were used. HepG2-NTCP cells were reverse-transfected with siRNA targeting *MB21D1* (sicGAS) or a nontargeting siRNA control 2 days before cGAS detection. β -actin was used as a western blot control. Individual representative experiments are shown. (B) Generation of *MB21D1* KO cells. *MB21D1* KO HepG2-NTCP cell lines were generated through CRISPR/Cas9 technology. The absence or presence of cGAS protein was controlled by western blot using the HPA031700 anti-cGAS antibody in Cas9-expressing HepG2-NTCP cells (Cas9) and in different cell lines after transduction with the sgRNA targeting *MB21D1* (line-A, line-B, line-C, cGAS_KO#1, and cGAS_KO#2). One experiment is shown. (C) Detection of endogenous STING protein in HepG2-NTCP cells. siRNA targeting *TMEM173* (siSTING) or a nontargeting siRNA (siCtrl) was reverse-transfected into HepG2-NTCP cells. Silencing efficacy was assessed by western blot. One experiment is shown. (D,E) Poly(I:C) and dsDNA transfection induce *IFNB1* and *MB21D1* expression in HepG2-NTCP cells. HepG2-NTCP cells were transfected with increasing doses of poly(I:C) or calf thymus DNA at the indicated concentrations. *IFNB1* mRNA expression was quantified by quantitative RT-PCR 24 hours after transfection, and cGAS protein expression was assessed by western blot 24 and 48 hours after transfection. Quantitative RT-PCR data (D) are expressed as means \pm SD relative to *IFNB1* expression (log10) compared to nontransfected control (0, set at 1) from four independent experiments performed in triplicate (dsDNA) or from three independent experiments performed in triplicate (poly I:C). One representative western blot experiment is shown (E).

independent donors (Fig. 1A). Because HBV infection of primary cells is highly variable and does not allow robust perturbation studies, we used an HBV infectious cell culture model based on differentiated hepatocyte-derived HepG2 cells overexpressing NTCP⁽³⁰⁾—a key HBV entry factor. cGAS protein is expressed in HepG2-NTCP cells (Fig. 1A). We validated the specificity of cGAS detection using an siRNA specifically targeting the *MD21B1* expression (sicGAS) and western blots applying two antibodies (Fig. 1A; Supporting Fig. S1). Moreover, we generated CRISPR-mediated *MB21D1* KO cells using a specific sgRNA (Fig. 1B). Two cell lines, KO_cGAS#1 and KO_cGAS#2, were selected for further studies (Fig. 1B). Interestingly, the adaptor STING was also detected in HepG2-NTCP cells, suggesting a fully

functional cGAS–STING pathway (Fig. 1C). To test the suitability of these cells as a model to analyze cGAS-mediated innate immune response after virus infection, we stimulated cells with different analogues of viral nucleic acids. Stimulation by poly(I:C) or dsDNA transfection elicited dose-dependent *IFNB1* expression in HepG2-NTCP cells (Fig. 1D). These results suggest that the cGAS sensing machinery is present and functional, even if it is less efficient than the RNA sensing complex. Moreover, cGAS protein expression was induced by both poly(I:C) and dsDNA stimulation, confirming an efficient IFN response through the up-regulation of ISGs such as *MB21D1*⁽³⁶⁾ after RNA or DNA stimulation (Fig. 1E). Collectively, these data show that the HepG2-NTCP model is suitable to study innate immune responses.

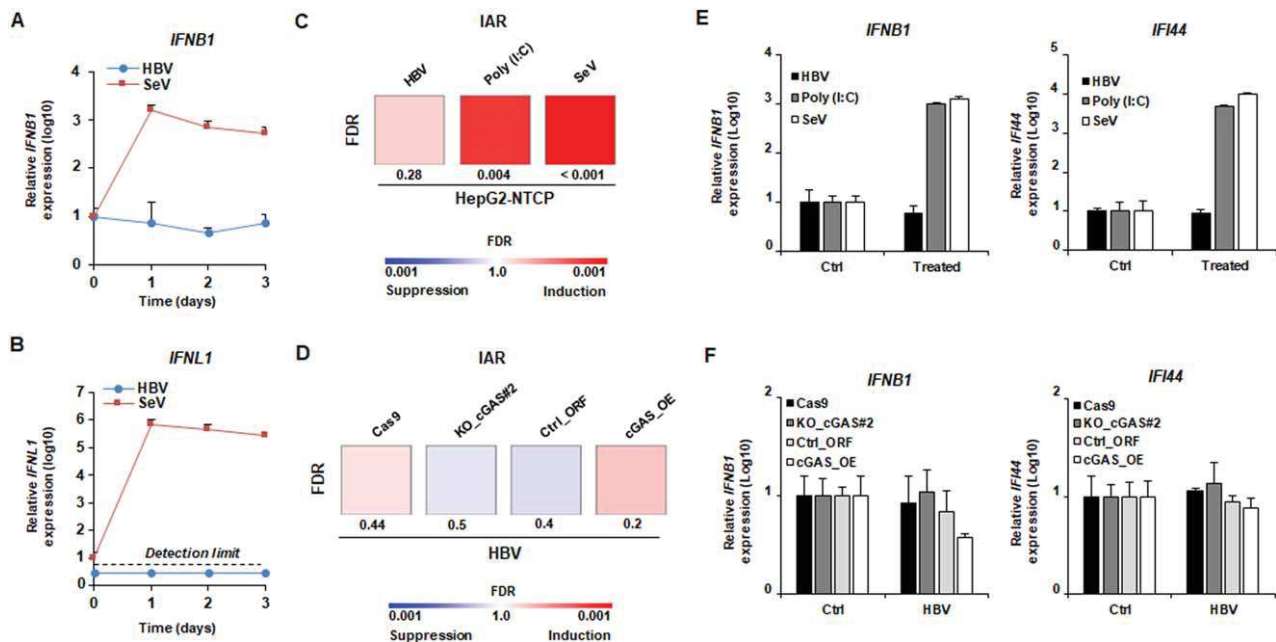


FIG. 2. Impaired cGAS-mediated sensing of HBV infection in HepG2-NTCP cells. (A,B) HBV infection does not induce *IFNB1* or *IFNL1* expression. HepG2-NTCP cells were infected with HBV (MOI, 500) or SeV (MOI, 10), and total RNA was extracted every day for 3 days. RNA extracted from naive cells before infection was used as a control (D0). *IFNB1* (A) and *IFNL1* (B) expression was then assessed by quantitative RT-PCR. Results are expressed as means \pm SD *IFNB1/IFNL1* relative expression (log10) compared to controls (D0, all set at 1) from three independent experiments performed at least in duplicate (SeV) or four independent experiments performed in duplicate (HBV). No robust *IFNL1* expression was detected in HBV-infected samples (representative dots are presented under the “detection limit” dotted line). (C,E) cGAS-related ISGs are not affected by HBV infection. HepG2-NTCP cells were infected with HBV or SeV. Alternatively, HepG2-NTCP cells were transfected with poly(I:C) (100 ng). Two days after infection or transfection, total RNA was extracted. Gene expression of IAR signature was then analyzed using multiplexed gene profiling. Results were analyzed by GSEA compared to nontransfected or noninfected controls (C) or by *IFNB1* and *IFI44* gene expression (log10) compared to nontransfected or noninfected controls (set at 1) (E). One experiment performed in triplicate is shown. (D,F) The cGAS expression level does not affect the cellular response to HBV infection. HepG2-NTCP-Cas9 (Cas9), HepG2-NTCP-KO_cGAS#2 (Ko_cGAS#2), HepG2-NTCP-Ctrl_ORF (Ctrl_ORF), and HepG2-NTCP-cGAS_OE (cGAS_OE) were infected with HBV. Two days after infection, total RNA was extracted. Gene expression of IAR signature gene set was then analyzed using multiplexed gene profiling. Results were analyzed by GSEA compared to nontransfected or noninfected controls (D) or by *IFNB1* and *IFI44* gene expression (log10) compared to nontransfected or noninfected controls (set at 1) (F). One experiment performed in triplicate is shown.

HBV EVADES cGAS SENSING

Next, we investigated whether HBV was sensed in HBV permissive cells. To address this question, we infected HepG2-NTCP cells with recombinant HBV (MOI, 500 GEq/cell) and studied the expression of *IFNB1* at early time points after HBV infection. Because it has been described that HBV infection may induce the expression of type III IFN,⁽⁷⁾ *IFNL1* expression was also quantified. The lack of increase in *IFNB1* and *IFNL1* expression despite efficient infection (Supporting Fig. S2) indicates poor or absent detection of HBV by cellular sensors (Fig. 2A,B). In contrast, SeV, known to induce a strong IFN response

in hepatocytes,⁽¹³⁾ strongly induced *IFNB1* and *IFNL1* expression (Fig. 2 A, B). Because cGAS has been shown to induce the expression of a large set of innate effector genes (such as *OAS2* and *IFI44*, see Schoggins et al.⁽²⁰⁾), the analysis of expression of a single effector gene such as *IFNB1* may not be sufficient to evaluate cGAS sensing. Therefore, we designed a 36 IAR gene set, comprising 29 ISGs whose expression is modulated by cGAS activity described by Schoggins et al.⁽²⁰⁾ as well as seven established innate immune response effector genes (Supporting Table S2). We then infected HepG2-NTCP cells with HBV or SeV and measured the innate antiviral immune response at day 2 postinfection by analysis of IAR gene

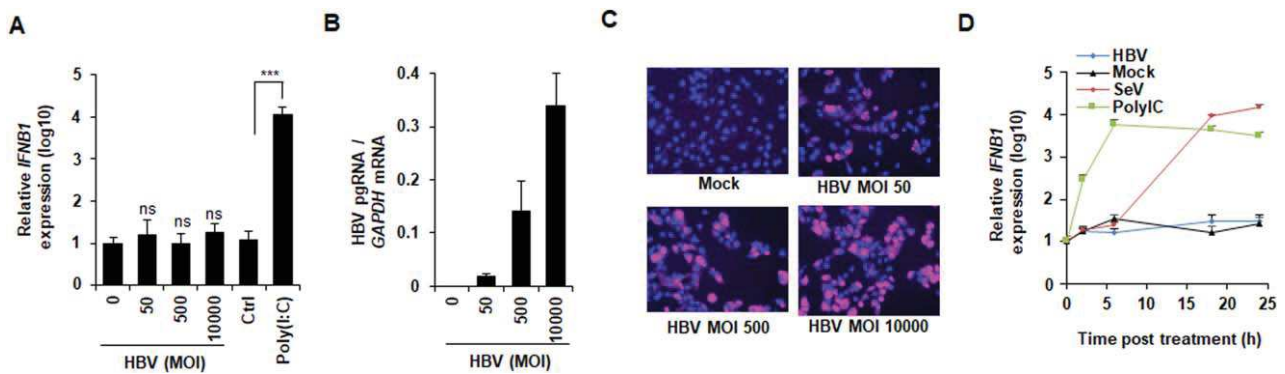


FIG. 3. Impaired sensing of HBV infection at high MOIs or early time points of infection. (A–C) HepG2-NTCP cells were infected with HBV at increasing MOIs (0, 50, 500, and 10,000 GEq/cell) or transfected with poly(I:C) (100 ng). Two days after infection or transfection, cells were lysed, total RNA was extracted, and *IFNB1* expression (A) as well as HBV pgRNA levels (B) were quantified by quantitative RT-PCR. (A) Results are expressed as means \pm SD relative to *IFNB1* expression (log10) compared to mock infected cells (MOI 0, set at 1) from three independent experiments performed in triplicate. (B) Results are expressed means \pm SD relative to HBV pgRNA levels compared to mock infected cells (MOI 0, set at 100%) from three independent experiments performed in triplicate. Alternatively, HBV infection was assessed at 10 days postinfection by immunofluorescence of HBsAg (C). One representative experiment is shown. (D) HBV infection does not induce *IFNB1* expression at early time points. HepG2-NTCP cells were either infected by HBV or SeV or transfected with poly(I:C). Total RNA was extracted at 2, 6, 18, and 24 hours postinfection/posttransfection, and *IFNB1* expression was assessed by quantitative PCR. Results are expressed as means \pm SD relative to *IFNB1* expression (log10) compared to naive cells (0, set at 1) from three independent experiments performed in triplicate.

expression using digital multiplexed gene profiling (nCounter NanoString) and GSEA-based analysis. Whereas poly(I:C) transfection and SeV infection induced a marked modulation of cGAS effector/IAR gene expression (FDR, 0.004 and <0.001 , respectively), no significant modulation of IAR gene expression was observed in HBV-infected cells (Fig. 2C), as further illustrated by the expression of *IFNB1* and *IFI44* (Fig. 2E). To measure the impact of cGAS expression on the cellular response to HBV infection, we then infected cGAS-depleted (KO_cGAS#2) and cGAS-overexpressing (cGAS_OE) HepG2-NTCP cells with HBV and analyzed the expression of the cGAS-related genes after infection. No significant modulation of the IAR signature was observed in HBV-infected samples (Fig. 2D), as further illustrated by absent modulation of *IFNB1* and *IFI44* expression (Fig. 2F).

To exclude the possibility that low HBV infection could be the reason for the absence of IFN induction, we performed additional experiments using increasing MOIs. No induction of *IFNB1* (Fig. 3A) was observed even at an MOI of 10,000, despite very high infection efficiency as shown by quantitation of pgRNA and immunofluorescence of HBsAg (Fig. 3B,C). To investigate whether IFN induction occurs potentially at a

very early step of viral infection and was missed in the experimental design shown above, we performed a time course study of the IFN response to HBV within the first 24 hours postinfection. HBV infection did not induce a measurable IFN response during early steps of HBV infection (Fig. 3D). In contrast, SeV, an established inducer of IFN, showed robust induction of IFN responses in HepG2-NTCP cells (Fig. 3D). Taken together, these data suggest an absence of sensing of HBV infection by the cGAS–STING pathway in HepG2-NTCP cells.

Because the HBV genome is packaged into the nucleocapsid,⁽³⁷⁾ we investigated whether packaging shields virion DNA from cGAS recognition. We purified HBV genomic rcDNA from HBV infectious particles (Supporting Fig. S3) and transfected the naked viral genome into HepG2-NTCP cells (1 μ g, corresponding to approximately 10^6 – 10^7 HBV DNA copies/ μ L). A significant (FDR, 0.02) induction of the IAR signature (illustrated by *IFNB1* and *IFI44* expression, Fig. 4B) was observed after both rcDNA and dsDNA transfection, suggesting sensing of the naked HBV genome (Fig. 4A). Interestingly, the number of cellular HBV DNA copies was higher in HBV-infected cells compared to rcDNA-transfected cells (Fig. 4C), confirming that the levels of HBV DNA in

HBV-infected cells are sufficient to trigger IFN signaling and that the absence of HBV sensing in infected cells was not due to low MOIs. Moreover, induction of IAR gene expression was absent in HepG2-NTCP-KO_cGAS#2 cells, suggesting a cGAS-specific activation of innate immunity by both dsDNA and rcDNA transfection in our model.

To validate these observations in a more physiological model, we infected PHHs with HBV and controlled cGAS gene expression after 2 days of infection. Interestingly, while SeV strongly induced IAR gene expression (Fig. 5B), a highly efficient HBV infection (Fig. 5A) did not induce the expression of IAR genes (Fig. 5B). In contrast, the transfection of rcDNA and dsRNA into PHHs from 4 different donors robustly triggered the expression of *IFNB1* and *IFNL1* (Fig. 5C), suggesting a robust sensing of viral DNA in human hepatocytes. Collectively, these data suggest that nonencapsidated HBV DNA is sensed by cGAS but that this sensing is impaired during HBV infection.

THE cGAS-STING PATHWAY EXHIBITS ROBUST ANTIVIRAL ACTIVITY AGAINST HBV INFECTION WITH REDUCTION OF cccDNA LEVELS

Because cGAS exhibits antiviral activity against a broad range of DNA and RNA viruses (even in the absence of direct viral sensing),⁽²⁰⁾ we then investigated the antiviral effect of the cGAS-STING signaling pathway in HBV infection. We silenced the expression *MB21D1*, *TMEM173* (encoding the STING protein), *TBK1*, and *IFI16* (another cytoplasmic DNA sensor able to directly activate STING⁽¹⁷⁾) in HepG2-NTCP cells prior to infection with HBV. Silencing of *MB21D1*, *TMEM173*, and *TBK1* expression induced a marked increase in HBV infection (Fig. 6A,B). In contrast, the silencing of *IFI16* had no effect on HBV infection. CRISPR/Cas9-mediated KO or overexpression of cGAS protein resulted in a marked increase or decrease in HBV infection and HBV cccDNA levels—the key viral nucleic acid responsible for viral persistence (Fig. 6C-E). Notably, overexpression of cGAS did not affect NTCP expression at the cell surface, suggesting that the susceptibilities of the different cell lines to HBV infection are equivalent (Supporting Fig. S4). Taken together, our results suggest that cGAS is functional and exerts antiviral activity in HBV permissive cells.

HBV INFECTION INDUCES REPRESSION OF cGAS AND ITS EFFECTOR GENE EXPRESSION IN CELL CULTURE AND IN LIVER CHIMERIC MICE

Because several reports have suggested that HBV proteins can inhibit IFN-signaling pathways,⁽¹⁶⁾ we next investigated whether HBV infection interferes with the expression of cGAS-related genes by quantifying *MB21D1*/cGAS mRNA and protein expression (Fig. 7A,B). Interestingly, cGAS protein expression (Fig. 7B) as well as expression of *MB21D1*, *TMEM173*, and *TBK1* mRNA (Fig. 7C) were significantly inhibited in HBV-infected cells. To confirm this observation *in vivo*, we then investigated the expression of human *MB21D1* expression in HBV-infected human liver chimeric mice. *MB21D1* was expressed at low but detectable levels (Fig. 7D). *MB21D1* expression was significantly ($P = 0.013$) down-regulated in HBV-infected mice compared to noninfected control mice, confirming our results in the cell culture model (Fig. 7E). Importantly, *MB21D1* expression levels did not correlate with HBV genotype (Table 1). An absent correlation of human serum albumin with either *MB21D1* expression (Table 1 and Fig. 7E) or status of HBV infection (Table 1; *t* test HBV versus control, $P = 0.26$) largely excludes the possibility that the observed differences in cGAS expression are due to different human hepatocyte repopulation levels or to a decrease of human hepatocyte cell viability in individual animals. To investigate whether HBV modulates cGAS effector function, we analyzed virus-induced changes on cGAS effector gene expression using gene expression profiling in three control mice and the three HBV-infected mice exhibiting the lowest levels of *MB21D1* expression (Table 1). HBV infection resulted in a significant (FDR, 0.047) down-regulation of the expression of cGAS effector genes in human hepatocytes in chimeric mice (Fig. 7F). The data showed that HBV represses expression of cGAS and its effector genes *in vivo*.

Discussion

The interaction between HBV and the innate immune system is a complex process that remains elusive and controversial.⁽¹⁵⁾ Collectively, our data demonstrate that in human hepatocytes (1) naked HBV genomic rcDNA is sensed in a cGAS-dependent manner, whereas the packaged HBV genome appears not

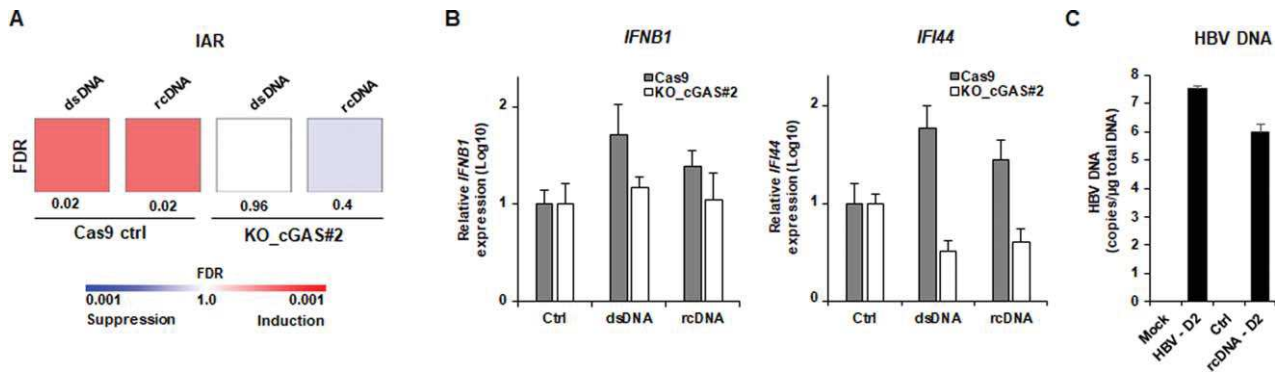


FIG. 4. Sensing of HBV rcDNA in HepG2-NTCP cells. (A,B) Transfection of purified HBV rcDNA genome induces a cGAS-mediated innate immune response. HBV rcDNA was extracted from recombinant HBV virions as described in Patients and Methods and quantified by quantitative PCR (Supporting Fig. S3). HBV rcDNA (1 μg) and positive control dsDNA (1 μg) were transfected into HepG2-NTCP-Cas9 and HepG2-NTCP-KO_cGAS#2 cells. Three days after transfection, total RNA was extracted. Gene expression of IAR set was then analyzed using multiplexed gene profiling. The transcripts were analyzed by GSEA compared to nontransfected control (A) or by *IFNB1* and *IFI44* gene expression (log10) compared to nontransfected control (set at 1) (B). One experiment in triplicate is shown. (C) HBV DNA in HepG2-NTCP cells after rcDNA transfection and HBV infection are similar. HepG2-NTCP cells were infected with HBV or transfected with HBV rcDNA (1 μg). At day 2 after transfection/infection, DNA was extracted and total HBV DNA was quantified by quantitative PCR. Results are expressed as means ± SD total DNA copies per microgram of total DNA (log10) from three independent experiments performed in triplicate (HBV infection) and two independent experiments performed in triplicate (HBV rcDNA transfection).

to be recognized during viral infection; (2) the cGAS–STING pathway exhibits antiviral activity against HBV infection including reduction of viral cccDNA levels; (3) HBV infection suppresses both cGAS

expression and function in cell culture and humanized liver chimeric mice.

The detection of HBV DNA by the cellular sensors within infected cells is still poorly understood and

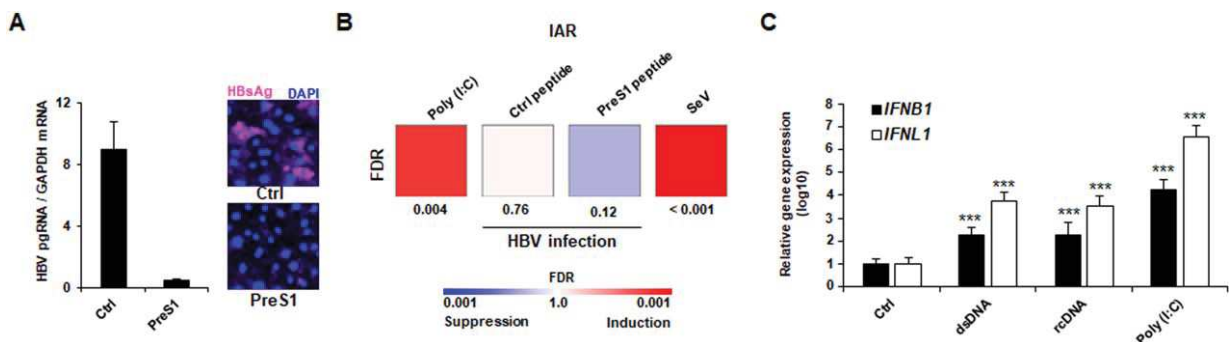


FIG. 5. Sensing of naked HBV rcDNA but not infectious HBV virions in PHHs. (A,B) HBV infection does not induce ISG expression in PHHs. PHHs were treated with a preS1 peptide or a scrambled peptide (control) for 1 hour before infection with HBV. As positive controls, PHHs were transfected with poly(I:C) (100 ng) or infected with SeV (MOI ~10). HBV infection of PHHs was assessed 10 days postinfection by quantitative RT-PCR (A, left panel) or immunofluorescence (A, right panel). Quantitative RT-PCR results are expressed as means ± SD ratio HBV pgRNA RNA/GAPDH mRNA from one experiment corresponding to the gene profiling experiment and performed in duplicate. Two days after infection, total RNA was extracted, and gene expression of IAR was then analyzed using multiplexed gene profiling. Results were analyzed by GSEA compared to nontransfected control (B). One experiment in triplicate is shown. (C) Induction of *IFNB1* and *IFNL1* expression in PHHs. PHHs were transfected with dsDNA (4 μg) or HBV rcDNA (4 μg). *IFNB1* and *IFNL1* expression was assessed 24 hours after transfection by quantitative RT-PCR. Results are expressed as means ± SD log10 *IFNB1* or *IFNL1* expression compared to nontransfected control cells (set at 1) from five independent experiments performed at least in duplicate. Abbreviation: DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole.

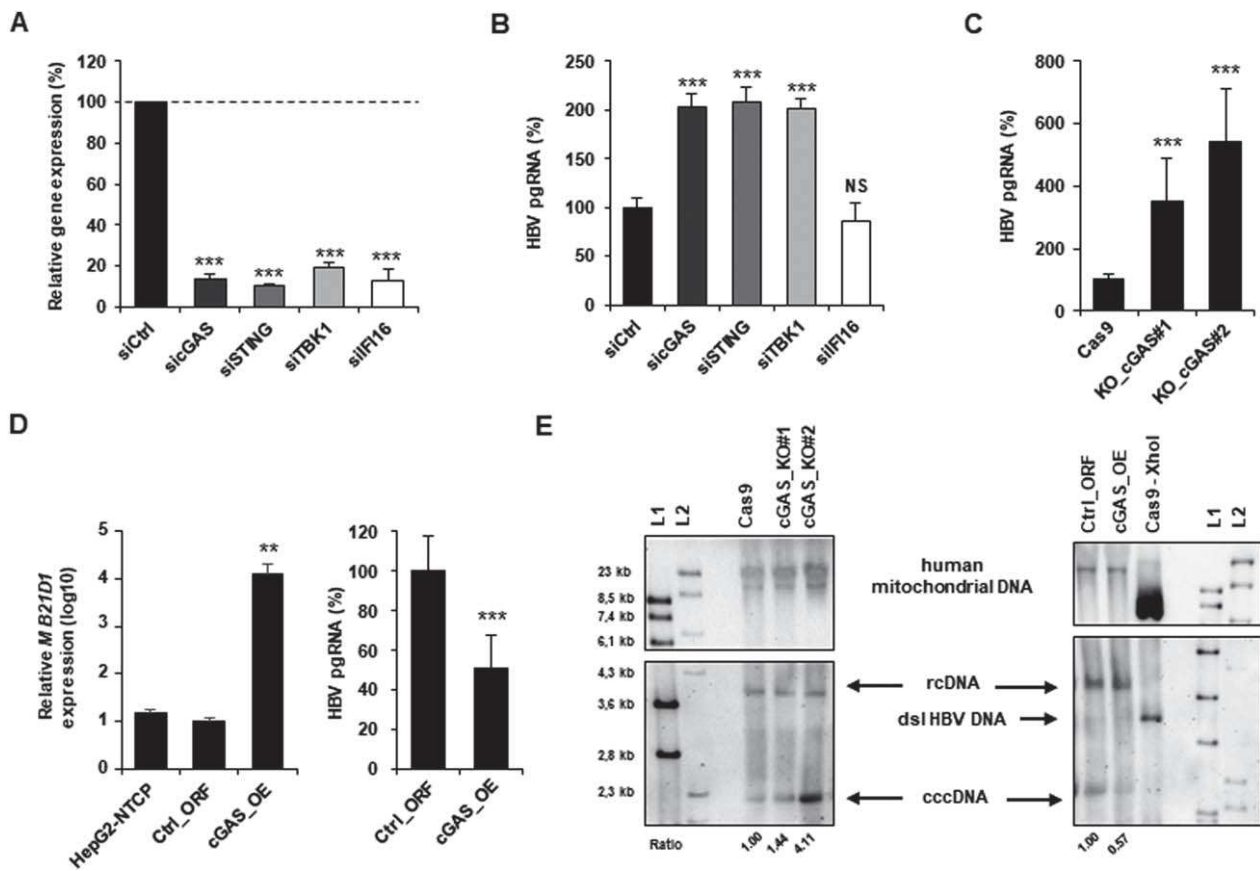


FIG. 6. Antiviral activity of cGAS results in reduction of HBV cccDNA. (A,B) Silencing of cGAS-related gene expression increases HBV infection. siRNA targeting *MB21D1* (siCGAS), *TMEM173* (siSTING), *TBK1* (siTBK1), or *IFI16* (siIFI16) or a nontargeting siRNA (siCtrl) were reverse-transfected into HepG2-NTCP cells 2 days prior to HBV infection. Silencing efficacy was assessed by quantitative RT-PCR 2 days after transfection (A). Results are expressed as means \pm SD percentage gene expression relative to siCtrl (set at 100%) from four independent experiments performed in technical duplicate. (C) KO of *MB21D1* gene increases HBV infection. cGAS_KO#1, cGAS_KO#2, and control Cas9 cells were then infected with HBV; and viral infection was assessed 10 days after infection as described above. Results are expressed as means \pm SD percentage HBV pgRNA expression relative to control cell line (Cas9, set at 100%) from three independent experiments performed in triplicate. (D) cGAS overexpression reduces HBV infection. HepG2-NTCP cells were transduced with lentivirus encoding either a control plasmid (Ctrl_ORF) or a plasmid encoding the full-length *MB21D1* ORF (cGAS_OE). *MB21D1* expression was assessed by quantitative RT-PCR (left panel). Results are expressed as means \pm SD percentage relative *MB21D1* expression (log10) relative to control cell line (Ctrl_ORF, set at 1) from three independent experiments performed in duplicate. HepG2-NTCP, Ctrl_ORF, and cGAS_OE cells were then infected with HBV for 10 days, and HBV infection was assessed as described above. Results are expressed as means \pm SD percentage HBV pgRNA expression relative to control cell line (Ctrl_ORF, set at 100%) from three independent experiments performed in triplicate. (E) Detection of HBV cccDNA by Southern blot. HepG2-NTCP-derived cGAS_KO or cGAS_overexpressing cell lines were infected for 10 days with HBV. Total DNA from indicated HBV-infected cells was extracted, and HBV DNA was detected by Southern blot. Two different DNA ladders (L1, L2) were used. *XhoI* digestion of DNA extracted from HBV-infected HepG2-NTCP-Cas9 cells was used as a control and resulted in a single 3.2-kb band (dsI HBV DNA). Mitochondrial DNA was detected as a loading control. One experiment is shown. Abbreviations: NS, nonsignificant; OE, overexpressing.

remains controversial. *In vitro* and *in vivo* data strongly suggest that HBV behaves like a stealth virus, unable to trigger any innate immune response.^(8,9,11) Other studies have suggested that HBV-derived dsDNA fragments⁽²⁵⁾ and viral nucleocapsid

destabilization and disassembly^(38,39) could induce innate immune responses. Our results demonstrate that in human hepatocytes—the natural target cell of HBV infection—exposure of the naked HBV genome leads to the activation of innate antiviral immune

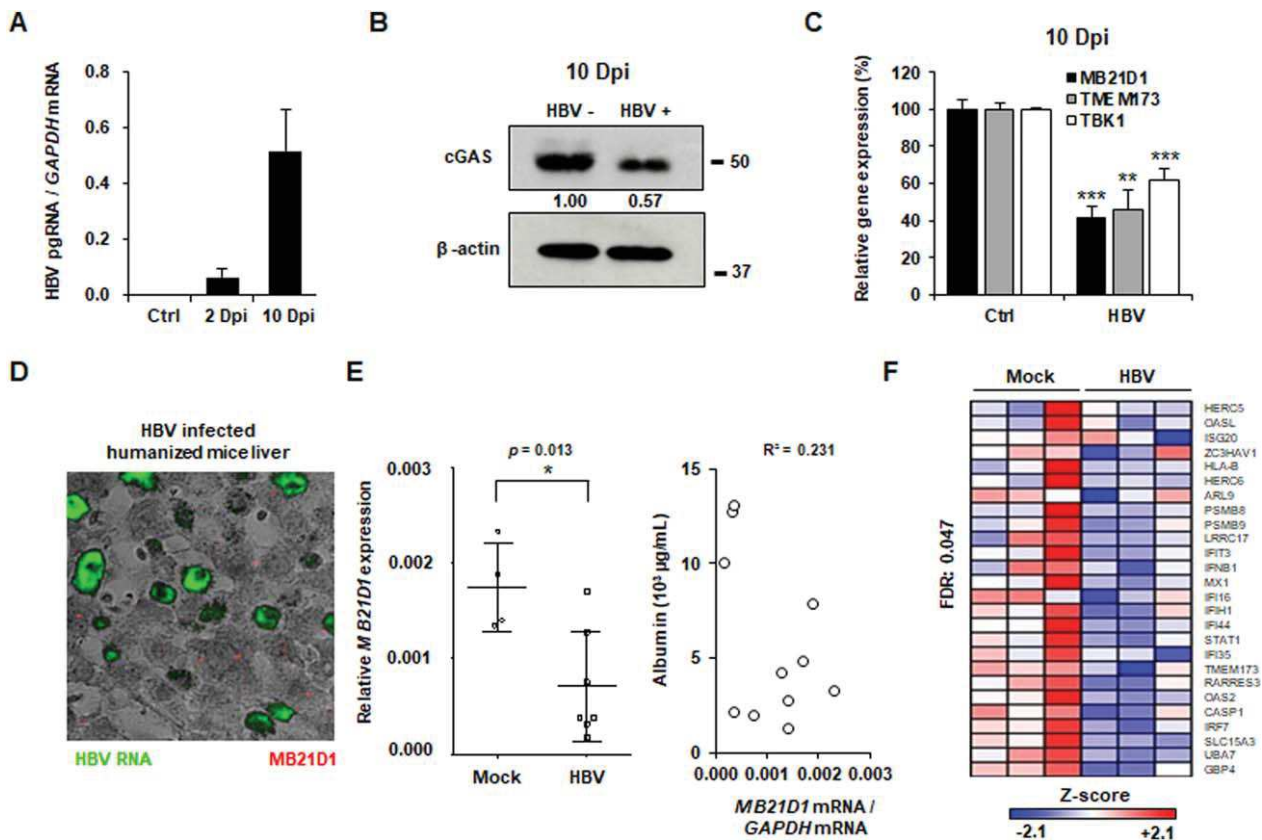


FIG. 7. HBV infection suppresses expression of the cGAS-related gene cell culture and humanized liver chimeric mice *in vivo*. (A–C) HepG2-NTCP cells were infected with HBV for 10 days. HBV infection was assessed by quantification of HBV pgRNA by quantitative RT-PCR. Results are expressed as means ± SD from three experiments performed in triplicate. cGAS protein expression was assessed 10 days after infection (B, one experiment is shown). Gene expression relative to noninfected control cells of *MB21D1*, *TMEM173*, and *TBK1* was assessed by quantitative RT-PCR at day 10 after infection (C). Results are expressed as means ± SEM from three independent experiments performed in triplicate. (D,E) *MB21D1* and IAR gene set expression is impaired in HBV-infected mice. uPA-SCID mice were infected with HBV for 16 weeks. Mice were then sacrificed, and HBV infection was assessed by HBV RNA-specific *in situ* hybridization (D) and quantification of HBV viral load in the serum (Table 1). Human *MB21D1* expression was detected in human hepatocytes by FISH from one HBV-infected mouse (D) and by quantitative RT-PCR from seven HBV-infected mice and four control mice (E, left panel). Results are expressed as the ratio *MB21D1* mRNA/*GAPDH* mRNA. All individual mice are presented as well as means ± SD for each group (mock and HBV-infected mice). The level of *MB21D1* expression was independent of the viability of engrafted human hepatocytes as indicated by an absent correlation between *MB21D1* expression and human serum albumin expression in humanized mice ($R^2 = 0.231$; E, right panel). (F) The IAR gene set was analyzed using the nCounter NanoString in mice 6472, 6251, and 6254 (mock infected mice, Table 1) and 4766, 4771, and 4847 (HBV-infected mice, Table 1). A significant down-regulation (FDR, 0.047) of the gene set was observed in HBV-infected mice compared to control mice. Individual Z scores for the genes significantly modulated between the two groups according to GSEA are presented. Negative Z score (blue) and positive Z score (red) correspond to repression and induction of the indicated genes, respectively. Abbreviation: Dpi, days postinfection.

responses. In contrast, sensing is largely absent during HBV infection, most likely due to packaging into the viral capsid. These results extend a previous observation in hepatoma cell lines transfected with replication-competent HBV DNA that the HBV genome itself can be recognized by the classical sensors.⁽²⁵⁾

Interestingly, the capsid of HIV-1 also prevents the sensing of HIV cDNA by cGAS following reverse-

transcription up to integration, whereas HIV-2 capsid may unmask the cDNA, leading to a stronger sensing by cGAS and a lower pathogenicity of the strain.⁽⁴⁰⁾

Another explanation of this absence of sensing would be the lack a functional STING protein in hepatocytes, as has been recently reported.⁽⁴¹⁾ In our study, rcDNA and dsDNA were sensed in a cGAS-dependent manner and able to activate the cGAS-

TABLE 1. cGAS Expression in HBV-Infected Human Liver Chimeric Mice

	Mouse	Albumin ($\mu\text{g/mL}$)	HBV (IU/mL)	<i>MB21D1</i> mRNA
Control	6410	1,280	—	1.40E-03
	6472	2,720	—	1.40E-03
	6251	3,240	—	2.30E-03
	6254	7,870	—	1.90E-03
HBV Gt E	4770	4,200	2.9E+07	1.30E-03
	4773	4,800	1.5E+08	1.70E-03
	4766	12,760	3.6E+06	3.20E-04
	4771	13,120	6.2E+05	3.70E-04
Gt D	4846	2,127	5.5E+05	3.80E-04
	4847	10,045	1.6E+08	1.70E-04
	4848	1,992	6.7E+06	7.50E-04

Levels of human albumin, HBV viral load, and *MB21D1* in liver tissue from HBV-infected and control mice are shown. *MB21D1* expression is normalized to *GAPDH* expression. The HBV genotype is indicated. Bold indicates mice used for multiplexed gene profiling.

Abbreviation: Gt, genotype.

mediated antiviral response in HepG2-NTCP cells (Fig. 4). Moreover, we detected STING at the protein level, in accordance with a recent study⁽⁴²⁾; and specific silencing of *TMEM173* (STING) expression was associated with a significant increase in HBV infection (Fig. 6). Consequently, it is likely that STING is functionally active in HepG2 cells. The observed HBV DNA sensing in PHHs (Fig. 5) suggests that the foreign DNA detection pathways are active in PHHs as well. This observed innate immune response despite weak STING expression may suggest a STING-independent activity of cGAS, as has been recently reported,⁽⁴³⁾ including in hepatocytes.⁽⁴⁴⁾ To understand the impact of cGAS and STING expression on the innate immune response to HBV infection, it would be of further interest to analyze the HBV-induced modulation of gene expression in Kupffer cells following phagocytosis as they exhibit higher STING and cGAS levels compared to hepatocytes^(41,45) and respond to HBV infection.⁽¹¹⁾ In the same vein, cGAMP has been shown to be packaged in viral particles.⁽⁴⁶⁾ It would be of interest to determine whether HBV particles can incorporate cGAMP during viral assembly and to test their ability to stimulate other cell types through this indirect pathway.

Moreover, our results show conclusively that cGAS basal expression has antiviral activity against HBV infection including reduction of viral cccDNA. This finding extends previous studies showing that cGAS

exhibited antiviral activity against a broad range of RNA and DNA viruses⁽²⁰⁾ and that the cGAS–STING pathway can impair HBV replication and assembly in transfection studies.^(24,25) Schoggins and colleagues proposed that expression of cGAS may be responsible for the establishment of a basal antiviral level in cells through its activation by an unknown ligand. cGAS-depleted cells may then be more susceptible to viral infections through the down-regulation of the basal level of innate antiviral genes.⁽²⁰⁾

Given its antiviral function, cGAS is a target of choice for viruses in order to evade immune responses. It has been reported that the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus negatively regulated the cGAS-dependent signaling pathway.^(47,48) In the same vein, HBV viral proteins have been shown to interfere with the Janus kinase–signal transducer and activator of transcription signaling pathway.⁽¹⁶⁾ Our data suggest that HBV can repress expression of the cGAS and its related genes, such as *MB21D1*, *TMEM173*, and *TBK1*. More interestingly, *MB21D1* expression was down-regulated in the liver of HBV-infected mice, validating the relevance of these findings *in vivo*. It still needs to be determined whether HBV can directly target cGAS and cGAS-related factors for an active inhibition of this signaling pathway. A recent study elegantly demonstrated an active inhibition of the cGAS pathway by dengue virus through nonstructural protein 2B.⁽⁴⁹⁾ On the other hand, *MB21D1* (as a classical member of the ISGs^(20,36)) down-regulation may be the consequence of global inhibition of the canonical IFN pathways by HBV, as suggested by some investigators^(16,50) but not by others.^(11,13,14) Given the antiviral activity of the cGAS–signaling pathway against HBV including reduction of HBV cccDNA (Fig. 6),^(24,25) the virus-mediated restriction of *MB21D1* expression may play an additional role in HBV immune evasion.

Acknowledgment: We thank D. Garcin (University of Geneva, Geneva, Switzerland) for providing the SeV inoculum; D. Calabrese, S. Wieland, and M. Heim (University of Basel, Basel, Switzerland) for the FISH analyses and helpful discussions; F. Zhang (Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA) for lentiCas9-Blast and lentiGuide-Puro plasmids; C. Thumann, N. Brignon, and M. Oudot (Inserm UMRS_1110) for excellent technical support; and J.M. Rousée (Laboratoire Schuergroupement Bio 67, Strasbourg, France) for the quantification of HBV loads in sera of humanized mice.

REFERENCES

- 1) Trepo C, Chan HL, Lok A. Hepatitis B virus infection. *Lancet* 2014;384:2053-2063.
- 2) Zeisel MB, Lucifora J, Mason WS, Sureau C, Beck J, Levrero M, et al. Towards an HBV cure: state-of-the-art and unresolved questions-report of the ANRS workshop on HBV cure. *Gut* 2015;64:1314-1326.
- 3) Levrero M, Testoni B, Zoulim F. HBV cure: why, how, when? *Curr Opin Virol* 2016;18:135-143.
- 4) Verrier ER, Colpitts CC, Sureau C, Baumert TF. Hepatitis B virus receptors and molecular drug targets. *Hepatol Int* 2016;10:567-573.
- 5) Nassal M. Hepatitis B virus cccDNA—viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut* 2015;64:1972-1984.
- 6) Lu HL, Liao F. Melanoma differentiation-associated gene 5 senses hepatitis B virus and activates innate immune signaling to suppress virus replication. *J Immunol* 2013;191:3264-3276.
- 7) Sato S, Li K, Kameyama T, Hayashi T, Ishida Y, Murakami S, et al. The RNA sensor RIG-I dually functions as an innate sensor and direct antiviral factor for hepatitis B virus. *Immunity* 2015;42:123-132.
- 8) Wieland S, Thimme R, Purcell RH, Chisari FV. Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:6669-6674.
- 9) Wieland SF, Chisari FV. Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses. *J Virol* 2005;79:9369-9380.
- 10) Fletcher SP, Chin DJ, Ji Y, Iniguez AL, Taillon B, Swinney DC, et al. Transcriptomic analysis of the woodchuck model of chronic hepatitis B. *HEPATOLOGY* 2012;56:820-830.
- 11) Cheng X, Xia Y, Serti E, Block PD, Chung M, Chayama K, et al. Hepatitis B virus evades innate immunity of hepatocytes but activates macrophages during infection. *HEPATOLOGY* 2017;66:1779-1793.
- 12) 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;63:1314-1322.
- 13) Suslov A, Boldanova T, Wang X, Wieland S, Heim MH. Hepatitis B virus does not interfere with innate immune responses in the human liver. *Gastroenterology* 2018;154:1778-1790.
- 14) Mutz P, Metz P, Lempp FA, Bender S, Qu B, Schoneweis K, et al. HBV bypasses the innate immune response and does not protect HCV from antiviral activity of interferon. *Gastroenterology* 2018;154:1791-1804.
- 15) Ferrari C. HBV and the immune response. *Liver Int* 2015;35(Suppl. 1):121-128.
- 16) Bertolotti A, Ferrari C. Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection. *Gut* 2012;61:1754-1764.
- 17) Chan YK, Gack MU. Viral evasion of intracellular DNA and RNA sensing. *Nat Rev Microbiol* 2016;14:360-373.
- 18) Gao D, Wu J, Wu YT, Du F, Aroh C, Yan N, et al. Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune sensor of HIV and other retroviruses. *Science* 2013;341:903-906.
- 19) Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* 2013;339:786-791.
- 20) Schoggins JW, MacDuff DA, Imanaka N, Gainey MD, Shrestha B, Eitson JL, et al. Pan-viral specificity of IFN-induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity. *Nature* 2014;505:691-695.
- 21) Xiao TS, Fitzgerald KA. The cGAS-STING pathway for DNA sensing. *Mol Cell* 2013;51:135-139.
- 22) Zhang X, Shi H, Wu J, Sun L, Chen C, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP containing mixed phosphodiester linkages is an endogenous high-affinity ligand for STING. *Mol Cell* 2013;51:226-235.
- 23) Wu J, Sun L, Chen X, Du F, Shi H, Chen C, et al. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* 2013;339:826-830.
- 24) He J, Hao R, Liu D, Liu X, Wu S, Guo S, et al. Inhibition of hepatitis B virus replication by activation of the cGAS-STING pathway. *J Gen Virol* 2016;97:3368-3378.
- 25) Dansako H, Ueda Y, Okumura N, Satoh S, Sugiyama M, Mizokami M, et al. The cyclic GMP-AMP synthetase-STING signaling pathway is required for both the innate immune response against HBV and the suppression of HBV assembly. *FEBS J* 2016;283:144-156.
- 26) Verrier ER, Colpitts CC, Schuster C, Zeisel MB, Baumert TF. Cell culture models for the investigation of hepatitis B and D virus infection. *Viruses* 2016;8:E261.
- 27) Israelow B, Narbus CM, Sourisseau M, Evans MJ. HepG2 cells mount an effective antiviral interferon-lambda based innate immune response to hepatitis C virus infection. *HEPATOLOGY* 2014;60:1170-1179.
- 28) Mailly L, Xiao F, Lupberger J, Wilson GK, Aubert P, Duong FH, et al. Clearance of persistent hepatitis C virus infection in humanized mice using a claudin-1-targeting monoclonal antibody. *Nat Biotechnol* 2015;33:549-554.
- 29) Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, Thumann C, Fofana I, Zona L, et al. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med* 2011;17:589-595.
- 30) Verrier ER, Colpitts CC, Bach C, Heydmann L, Weiss A, Renaud M, et al. A targeted functional RNAi screen uncovers glypican 5 as an entry factor for hepatitis B and D viruses. *HEPATOLOGY* 2016;63:35-48.
- 31) Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods* 2014;11:783-784.
- 32) 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;145:14-19.
- 33) Gao W, Hu J. Formation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA: removal of genome-linked protein. *J Virol* 2007;81:6164-6174.
- 34) Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:15545-15550.
- 35) Wieland S, Makowska Z, Campana B, Calabrese D, Dill MT, Chung J, et al. Simultaneous detection of hepatitis C virus and interferon stimulated gene expression in infected human liver. *HEPATOLOGY* 2014;59:2121-2130.
- 36) Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, Bieniasz P, et al. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* 2011;472:481-485.
- 37) Blondot ML, Bruss V, Kann M. Intracellular transport and egress of hepatitis B virus. *J Hepatol* 2016;64(1 Suppl.):S49-S59.
- 38) Cui X, Clark DN, Liu K, Xu XD, Guo JT, Hu J. Viral DNA-dependent induction of innate immune response to hepatitis B

- virus in immortalized mouse hepatocytes. *J Virol* 2015;90:486-496.
- 39) Cui X, Luckenbaugh L, Bruss V, Hu J. Alteration of mature nucleocapsid and enhancement of covalently closed circular dna formation by hepatitis B virus core mutants defective in complete-virion formation. *J Virol* 2015;89:10064-10072.
- 40) **Lahaye X, Satoh T**, Gentili M, Cerboni S, Conrad C, Hurbain I, et al. The capsids of HIV-1 and HIV-2 determine immune detection of the viral cDNA by the innate sensor cGAS in dendritic cells. *Immunity* 2013;39:1132-1142.
- 41) Thomsen MK, Nandakumar R, Stadler D, Malo A, Valls RM, Wang F, et al. Lack of immunological DNA sensing in hepatocytes facilitates hepatitis B virus infection. *HEPATOLOGY* 2016;64:746-759.
- 42) **Cho CS, Park HW**, Ho A, Semple IA, Kim B, Jang I, et al. Lipotoxicity induces hepatic protein inclusions through TBK1-mediated p62/SQSTM1 phosphorylation. *HEPATOLOGY* 2017; doi:10.1002/hep.29742. [Epub ahead of print]
- 43) Yang H, Wang H, Ren J, Chen Q, Chen ZJ. cGAS is essential for cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017;114:E4612-E4620.
- 44) Lei Z, Deng M, Yi Z, Sun Q, Shapiro RA, Xu H, et al. cGAS-mediated autophagy protects the liver from ischemia/reperfusion injury independent of STING. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2018; doi:10.1152/ajpgi.00326.2017. [Epub ahead of print]
- 45) Leong CR, Oshiumi H, Okamoto M, Azuma M, Takaki H, Matsumoto M, et al. A MAVS/TICAM-1-independent interferon-inducing pathway contributes to regulation of hepatitis B virus replication in the mouse hydrodynamic injection model. *J Innate Immun* 2015;7:47-58.
- 46) Gentili M, Kowal J, Tkach M, Satoh T, Lahaye X, Conrad C, et al. Transmission of innate immune signaling by packaging of cGAMP in viral particles. *Science* 2015;349:1232-1236.
- 47) **Wu JJ, Li W**, Shao Y, Avey D, Fu B, Gillen J, et al. Inhibition of cGAS DNA sensing by a herpesvirus virion protein. *Cell Host Microbe* 2015;18:333-344.
- 48) Li W, Avey D, Fu B, Wu JJ, Ma S, Liu X, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus inhibitor of cGAS (KicGAS), encoded by ORF52, is an abundant tegument protein and is required for production of infectious progeny viruses. *J Virol* 2016;90:5329-5342.
- 49) Aguirre S, Luthra P, Sanchez-Aparicio MT, Maestre AM, Patel J, Lamothe F, et al. Dengue virus NS2B protein targets cGAS for degradation and prevents mitochondrial DNA sensing during infection. *Nat Microbiol* 2017;2:17037.
- 50) Ortega-Prieto AM, Skelton JK, Wai SN, Large E, Lussignol M, Vizcay-Barrena G, et al. 3D microfluidic liver cultures as a physiological preclinical tool for hepatitis B virus infection. *Nat Commun* 2018;9:682.

Author names in bold designate shared co-first authorship.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found at onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.30054/supinfo.

**Annexe 2 : Verrier *et al.*,
Gut, 2020**



Combined small molecule and loss-of-function screen uncovers estrogen receptor alpha and CAD as host factors for HDV infection and antiviral targets

Eloi R Verrier,¹ Amélie Weiss,² Charlotte Bach,¹ Laura Heydmann,¹ Vincent Turon-Lagot,¹ Arnaud Kopp,² Houssein El Saghire,¹ Emilie Crouchet,¹ Patrick Pessaux ,^{1,3} Thomas Garcia,⁴ Patrick Pale,⁴ Mirjam B Zeisel,¹ Camille Sureau,⁵ Catherine Schuster,¹ Laurent Brino,² Thomas F Baumert ^{1,3,6}

¹Université de Strasbourg, Inserm, Institut de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques UMR_S1110, F-67000 Strasbourg, France
²IGBMC, Plateforme de Criblage Haut-débit, UMR7104 CNRS U1258 Inserm, Illkirch, France
³Institut Hospitalo-universitaire, Pôle Hépatologie-digestif, Nouvel Hôpital Civil, Strasbourg, France
⁴Laboratoire de Synthèse, Réactivité Organiques et Catalyse, Institut de Chimie, UMR 7177 CNRS, Université de Strasbourg, Strasbourg, France
⁵INTS, Laboratoire de Virologie Moléculaire, Paris, France
⁶Institut Universitaire de France, Paris, France

Correspondence to

Dr Eloi R Verrier and Pr Thomas F Baumert, Inserm UMR_S1110, Institut de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques, 3 rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France; e.verrier@unistra.fr, thomas.baumert@unistra.fr

Received 26 June 2018

Revised 24 January 2019

Accepted 10 February 2019

Published Online First

4 March 2019



© Author(s) (or their employer(s)) 2020. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

To cite: Verrier ER, Weiss A, Bach C, et al. *Gut* 2020;**69**:158–167.

ABSTRACT

Objective Hepatitis D virus (HDV) is a circular RNA virus coinfecting hepatocytes with hepatitis B virus. Chronic hepatitis D results in severe liver disease and an increased risk of liver cancer. Efficient therapeutic approaches against HDV are absent.

Design Here, we combined an RNAi loss-of-function and small molecule screen to uncover host-dependency factors for HDV infection.

Results Functional screening unravelled the hypoxia-inducible factor (HIF)-signalling and insulin-resistance pathways, RNA polymerase II, glycosaminoglycan biosynthesis and the pyrimidine metabolism as virus-hepatocyte dependency networks. Validation studies in primary human hepatocytes identified the carbamoyl-phosphatesynthetase 2, aspartate transcarbamylase and dihydroorotase (CAD) enzyme and estrogen receptor alpha (encoded by *ESR1*) as key host factors for HDV life cycle. Mechanistic studies revealed that the two host factors are required for viral replication. Inhibition studies using N-(phosphonoacetyl)-L-aspartic acid and fulvestrant, specific CAD and ESR1 inhibitors, respectively, uncovered their impact as antiviral targets.

Conclusion The discovery of HDV host-dependency factors elucidates the pathogenesis of viral disease biology and opens therapeutic strategies for HDV cure.

INTRODUCTION

Hepatitis delta virus (HDV) infects human hepatocytes and causes acute exacerbation of liver disease in patients chronically infected with hepatitis B virus (HBV).¹ Among HBV-infected patients, 5%–10% are coinfecting with HDV.² HDV coinfection or surinfection in HBV carriers induces more severe disease compared with infection with HBV alone. This includes a greater likelihood of experiencing liver failure and a more rapid progression to liver cirrhosis, with a markedly increased risk of developing hepatocellular carcinoma.³ Consequently, chronic hepatitis D is considered as one of the most severe forms of viral hepatitis. Treatment with HBV nucleos(t)ide analogues is not effective at reducing HDV replication or disease. Moreover, the virus is only poorly controlled by the current interferon (IFN)-based therapies.³ To date, no treatment

Significance of this study

What is already known on this subject?

- ▶ Chronic hepatitis D is the most severe form of viral hepatitis.
- ▶ Efficient therapeutic strategies are absent.
- ▶ Hepatitis D virus is a small hepatitis B virus satellite virus.
- ▶ Knowledge about HDV–hepatocyte interactions is limited.
- ▶ HDV host-dependency factors are largely unknown.

What are the new findings?

- ▶ A RNAi screen identified oestrogen receptor 1 (ESR1) and CAD as novel host factors for HDV infection.
- ▶ The inhibition of CAD restricts HDV infection through uridine depletion.
- ▶ ESR1 and CAD are functionally linked by transcriptional activation of gene expression.
- ▶ ESR1 and CAD inhibitors fulvestrant and PALA, respectively, specifically inhibit HDV replication in a dose-dependent manner in human hepatocytes.
- ▶ CAD and ESR1 are previously undiscovered targets for antiviral therapies.

How might it impact on clinical practice in the foreseeable future?

- ▶ The discovery of HDV host-dependency factors opens the door for novel therapeutic strategies against chronic hepatitis D - a major unmet medical need.
- ▶ Fulvestrant and PALA-like molecules are candidate compounds for HDV antivirals to enter preclinical development.

allows efficient cure of hepatitis D with eradication of the virus and its associated disease.^{4–6} Thus, there is a major unmet medical need for curative therapies.

HDV is a small, circular RNA HBV satellite virus related to plant viroids using HBV envelope proteins to assemble its infectious particles.^{1 5 6} Consequently, it can only be propagated by HBV-infected

hepatocytes producing HBV envelope proteins (Hepatitis B surface antigen or HBsAg). The HDV genome is a circular 1.7 kb single-stranded negative-sense RNA molecule (for a review on HDV virology and pathogenesis, see ref 5). The HDV life cycle starts with virus entry into hepatocyte after attachment to heparan sulfate proteoglycans (HSPG) at the cell surface.^{5,7} As HBV and HDV share the same envelope proteins, they appear to share the same entry pathway and receptor(s), including the sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) and glypican 5 (reviewed in refs 5 6 8). The HDV genome is then imported in the nucleus, and three types of RNAs are transcribed by the host RNA polymerase II: replication is initiated by synthesis of an antigenomic RNA that serves as a template for the production of new HDV genomic RNA and HDV mRNA from genomic RNA.⁵ mRNA transcripts contain one unique open reading frame encoding the hepatitis delta antigen (HDAG) that exists in two forms (small version [S-HDAG] and large version [L-HDAG]) which play differential roles in the HDV life cycle.^{5,6} Indeed, S-HDAG is essential to HDV replication, while prenylation of L-HDAG leads to the inhibition of HDV replication and is crucial for binding to HBV envelope proteins and virion assembly.⁶ In the nucleus, L-HDAGs bind to the de novo HDV genomic RNA to form a new ribonucleoprotein, which is exported to the cytoplasm and interacts with HBsAg at the endoplasmic reticulum to form new infectious virions that are then secreted to propagate further rounds of HDV infection.⁶ While the molecular virology of HDV has been elucidated, the role of host-dependency factors for HDV infection remains largely unknown.⁵

A unique feature of HDV is the apparent lack of non-structural protein encoded by the viral genome (including viral polymerase), making it highly dependent of the host machinery for its replication. Targeting host factors is an emerging concept in the treatment of infectious diseases including hepatitis viruses.⁹⁻¹² Two host compounds targeting HDV factors have been developed up to clinical proof of concept: these include Myrcludex B, a small peptide targeting HBV/HDV entry factor NTCP, and the prenylation inhibitor lonafrani.^{4 13 14} Both compounds demonstrated a significant clinical antiviral effect in chronically infected patients,^{4 13 14} supporting the validity of the concept of host-targeting antivirals for HDV infection. However, data on long-term safety, potential resistance in subsets of patients and sustained virological response remain to be determined. Thus, complementary approaches targeting other host factors and/or steps of the HDV life cycle are needed for curative therapies.

Taking advantage of our recently developed robust HDV infection system for the study of HDV–host factor interactions⁷ combined with a dual screening approach, we aimed to uncover HDV host-dependency factors as antiviral targets.

RESULTS

A high-throughput RNAi loss-of-function screen uncovers hepatocyte host-dependency factors required for HDV infection

To identify host factors required for HDV infection, we performed a high-throughput loss-of-function screen using the HDV-susceptible cell line Huh-106.⁷ Since one key goal was the discovery of druggable host targets, we used a library comprising siRNAs targeting 7567 genes, which have been selected as targets for therapeutics, including kinases, proteases, phosphatases, G protein-coupled receptor, ion channels, ubiquitin ligases, proteins involved in senescence, autophagy, DNA repair and targetable nuclear receptors. Huh-106 cells were

transfected with siRNAs pools 48 hours before inoculation with HDV (figure 1A) with an optical immunostaining-based viral protein (HDAG) readout 7 days after infection. The silencing of expression of HDV host factor NTCP was used as functional positive control (figure 1B-C). The results of the primary screen are presented in online supplementary table S1.

Using the hit selection algorithm described in online supplementary material and methods and figure 1E, we identified 191 host factor genes showing a robust correlation between gene silencing and level of HDV infection, moderate toxicity of gene-specific siRNA and their expression in the liver (figure 1D,E and online supplementary table S2). The threshold of hit selection (described in figure 1E) was based on the functional effect of *SLC10A1* silencing (approximately 45% decrease in HDV infection, online supplementary table S1). The hit rate of 191 genes corresponds to 2.5% of total genes, which is similar to screens for other virus host factor-dependency screens.^{15 16}

Functional pathway analysis using KEGG pathways identified a network of host factors belonging to HSPG biosynthesis, including *EXT1* and *EXT2* (figure 2A,B). These genes encode two major exostosins, key HSPG-related enzymes exhibiting glycosyltransferase activities and involved in the elongation of heparan sulfate chains.¹⁷ Moreover, several subunits of the RNA polymerase II were identified in our screen (figure 2B), including specific subunits such as *POLR2G* or *POLR2I*, encoding Rpb7 and Rpb9, which play key roles in the initiation of transcription and binding to DNA template for an accurate selection of the transcription start sites, respectively.^{18 19} The identification of HSPG enzymes and RNA polymerase II as known HDV-related pathways^{5 7} validates our approach for host factor discovery (figure 2). Importantly, the screen identified several previously unknown HDV-related networks, such as the hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF-1 α) signalling pathway, known to enhance the replication of several RNA and DNA viruses such as Epstein-Barr virus and HIV.^{20 21} Interestingly, the HIF-1 α signalling pathway also plays a key role in hepatocarcinogenesis and liver tumour progression^{22 23} through its ability to target the expression of oncogenic genes such as the proliferation-specific transcription factor Forkhead box M1.²⁴ HIF-1 α overexpression in HCC has been correlated with worse clinical outcomes and is considered as a poor prognosis factor and molecular target for liver disease therapy.²⁴ Interestingly, the highly significant scoring of insulin resistance-related pathways highlights the importance of hepatocyte metabolism as host-dependency factors on HDV infection (figure 2).

Finally, we identified several host factors involved in the biosynthesis of pyrimidine, including *CANT1*, *ENTPD5* and *CAD*.

The pyrimidine biosynthesis enzyme CAD is a key host factor for HDV infection and antiviral target in human hepatocytes

Given its high impact on HDV infection, functional relevance, liver expression and targetability, we focused on *CAD*, encoding the carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase and dihydroorotase (CAD), an enzyme playing a key role in the pyrimidine biosynthesis (online supplementary table S2; figure 2).²⁵ Silencing of *CAD* led to a robust decrease in HDV infection (figure 3A). *CAD* is a trifunctional enzyme catalysing the first steps of pyrimidine biosynthesis.²⁶ Interestingly, *CAD* expression is known to be regulated by activated estrogen receptor alpha (or estrogen receptor 1, ESR1), which binds to the transcription factor SP1,²⁷ two other host-dependency factors uncovered by the RNAi screen (figure 3A). These data

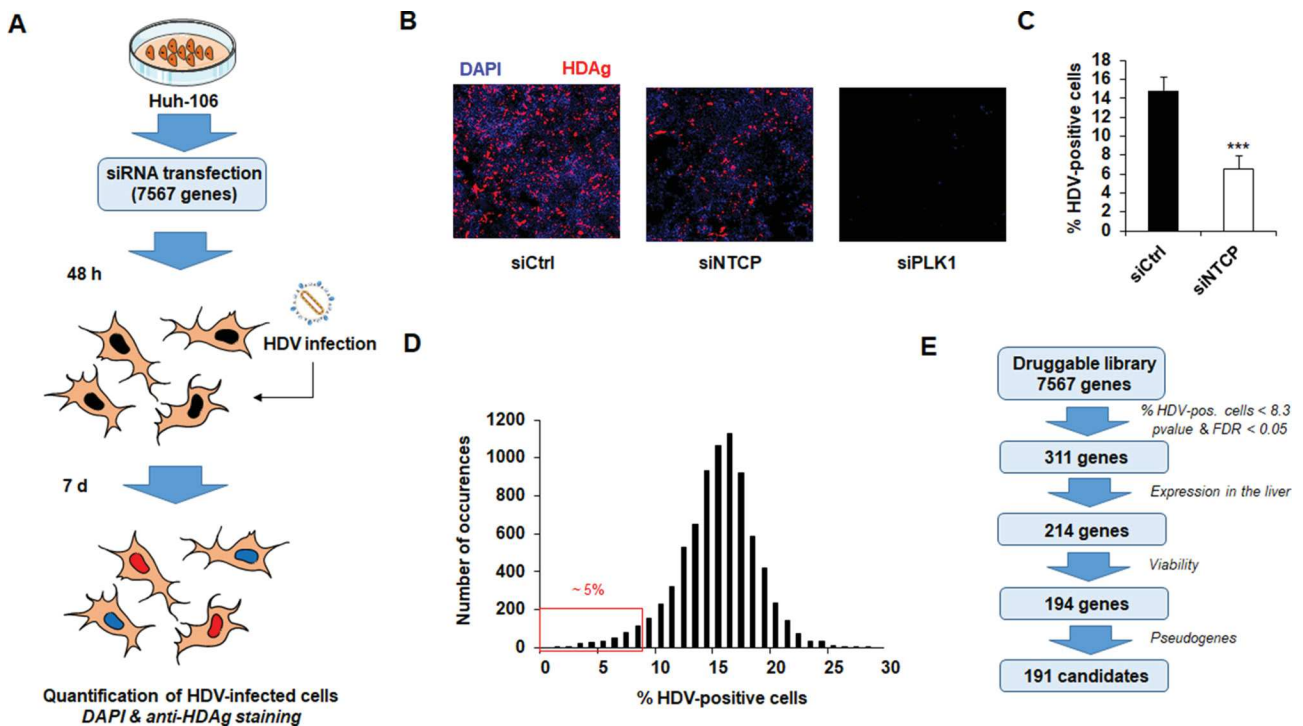


Figure 1 Identification of host-dependency factors for HDV infection using a high-throughput RNAi screen. (A). Approach with flow chart of the screen. NTCP-overexpressing Huh7 cells (termed Huh-106) were transfected with pools of four siRNAs per target of the Dharmacon 'Druggable genome' library 48 hours before HDV infection. Infection was assessed after 7 days by immunofluorescence. Each siRNA pool was tested in triplicate. As controls, Huh-106 cells were transfected with a non-targeting siRNA control (siCtrl), siRNA targeting *SLC10A1* (siNTCP) and *PLK1* (siPLK1, lethal for the cells) expression. Representative images of HDV infection in Huh-106 cells from the primary screen are shown in B. As readout for infection, cells were stained with an anti-HDAG antibody and cell nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). (C) General effect of the siNTCP on HDV infection at the screen level. Results are expressed as means \pm SD % HDV-positive cells from siCtrl-treated cells (n=318) and siNTCP-treated cells (n=265). ****p* value <0.001 (unpaired Student's *t*-test). (D). Distribution of host-factor candidates according to their inhibitory effect on HDV infection. The top 5% (% HDV positive cells <8.3) were selected as candidates for further work-up. (E). Selection of candidate genes from the primary screen. From the 311 genes inducing a >45% decrease in HDV infection after silencing, candidate genes were selected depending on their robustness (*p* value and false discovery rate (FDR) <0.05), their expression in the liver (Illumina Body Map tool) and their toxicity. Toxicity was evaluated as the percentage of viability compared with the siCtrl, quantified by counting the DAPI-positive nuclei in the wells at the end of infection. From the 194 selected candidates, *RNF130* was present twice (subset 8 and subset 10), and two pseudogenes (*TAKRIAKR1C6P* and *LOC402164*) were removed. One hundred and ninety-one candidates (top 2.5%) were further worked up. HDV, hepatitis D virus; NTCP, sodium taurocholate cotransporting polypeptide.

suggest a key role of the pyrimidine biosynthesis pathway and its associated nuclear proteins for the HDV life cycle.

We next investigated the functional role of CAD in HDV infection. We first performed additional silencing studies using individual CAD-specific siRNA. As shown in figure 3B–D, a strong reduction of HDV RNA was observed after transfection of Huh-106 cells with the four individual siRNAs composing the siRNA pool, validating the key role of CAD expression in HDV infection. Notably, CAD expression was not significantly affected by HDV infection (figure 3E).

Aiming to characterise the potential of CAD as an antiviral target, we synthesised a specific inhibitor of CAD, sparfosic acid or N-(phosphonoacetyl)-L-aspartic acid (PALA).²⁶ PALA is an aspartic acid derivative, which inhibits the aspartate carbamoyltransferase activity of the enzyme. We then investigated the antiviral activity of PALA in HDV-infected Huh-106 cells. As shown in figure 3F, PALA dose dependently inhibits HDV infection with an IC_{50} = 1.2 μ M. Notably, a decrease in cell viability was observed after 7 days of culture.

To validate this result in the most physiological model for HDV infection, we investigated the antiviral activity of PALA using HDV infection of primary human hepatocytes (PHHs). Interestingly, while no toxicity was observed in PHH even at

high doses (100 μ M), the IC_{50} of PALA was slightly higher in PHH (figure 3G), which may reflect differences in uridine pools and/or CAD expression in rapidly dividing Huh7-based cells versus non-dividing PHH in cell culture.²⁸

To investigate the mechanism of action of CAD–HDV interaction, we performed a rescue experiment using PALA and uridine-supplemented medium. Northern blot detection of HDV genomic RNA in infected cells revealed that the addition of uridine in PALA-treated cells restored HDV infection, validating the functional relevance of pyrimidine pathway for HDV replication (figure 4A). Notably, PALA at a concentration of 2.5 μ M induced a strong decrease in HDV infection, which was efficiently rescued by uridine treatment (figure 4B,C). This dose was then selected for further functional studies. Importantly, no direct interaction was observed between CAD and the HDV antigens (figure 4D). As the inhibition of pyrimidine pathway has been shown to stimulate the innate antiviral response with subsequent inhibition of viral propagation,²⁹ we next assessed the expression of *IFNB1* following PALA treatment in Huh-106 cells. As shown in figure 4E, no *IFNB1* induction was observed after treatment with either PALA or Brequinar, targeting dihydroorotate dehydrogenase (DHODH), suggesting an absence of innate immune stimulation by pyrimidine inhibitors in hepatocyte-derived cells.

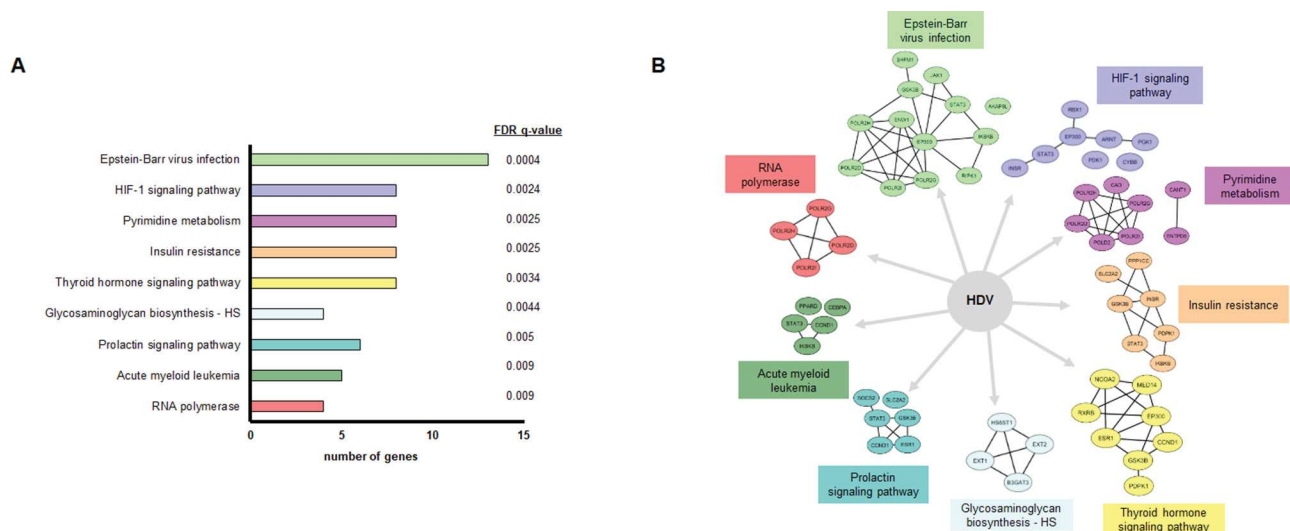


Figure 2 Pathway analysis of HDV host factors identified within the RNAi screen. The identified host genes were subjected to functional enrichment pathway analysis through ToppGene Suite (<https://toppgene.cchmc.org>) using Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database. Pathways scoring at a FDR value of < 0.05 were considered significant. (A) Representation of the number of genes and FDR values of different KEGG pathways significantly enriched within the primary siRNA screen candidates. (B) Individual genes contributing to the enrichment of the significant KEGG pathways were further analyzed for protein-protein interactions using STRING database. Interaction networks were represented using Cytoscape 3.6.0.

To further validate the involvement of the biological function of CAD in HDV infection, cell culture medium was then complemented using either glutamine (Glu; the initial substrate of CAD) or dihydroorotate (DHO; the final product of CAD) (figure 5A, as described in ref 25). As shown in figure 5B and online supplementary figure S1, while Glu treatment had no effect on intracellular HDV RNA, DHO treatment in PALA-treated cells restored HDV RNA to non-treated levels, suggesting that PALA antiviral activity is linked to CAD physiological function.

To map the replication steps mediated by CAD and targeted by PALA, we performed northern blot analyses of HDV RNA allowing to quantify the HDV genome and antigenome in the presence or absence of PALA. As shown in figure 5C, PALA treatment effectively decreased the levels of both HDV genomic and antigenomic RNAs. Moreover, this inhibition was already observed during the early stages of viral replication (online supplementary figure S1). These data demonstrate that PALA inhibits all the steps of HDV replication including the synthesis of antigenomic RNA (figure 5C).

Next, we performed kinetic studies adding PALA preinfection, peri-infection and HDV postinfection (figure 5D). PALA potently inhibited HDV infection given at any time before, during and following initiation of replication. Interestingly, the inhibitory effect was most pronounced when PALA was added prior or during initiation of replication. Finally, to exclude effects on other steps of the early HDV life cycle, we studied the effect of PALA treatment on HDV binding to the Huh-106 cell surface. The absent effect on HDV binding further confirms HDV replication as the life cycle step targeted by PALA (figure 5E).

To test the specificity of the pyrimidine pathway for HDV infection, we treated HBV-producing HepAD38 cells with PALA. As shown in figure 5F, PALA did not modulate HBV antigen production as shown by an absent effect on HBeAg and HBsAg secretion. While tenofovir (TFV) treatment dose-dependently inhibited HBV replication, PALA had no effect on HBV DNA in the supernatant of HepAD38 cells (figure 5G). Finally, the silencing of CAD expression did not affect HBV infection in HepG2-NTCP cells (figure 5H). These results suggest that the

pyrimidine/CAD pathway is relevant for HDV but not HBV replication. Collectively, our results identify CAD as a key HDV host factor involved in HDV replication and target for antiviral therapy.

A small molecule screen uncovers ESR1 inhibitor fulvestrant as host targeting agent

Next, we performed a small molecule screen using the Prestwick library, containing 1280 drugs approved by the Food and Drug Administration (FDA) (figure 6A). Among the molecules exhibiting an antiviral activity against HDV, we identified fluvastatin and cyclosporin A, two well-described NTCP inhibitors (online supplementary table S3), confirming the validity of the screen. Interestingly, ribavirin, a broad antiviral nucleoside analogue³⁰ previously used for the treatment of chronic hepatitis C³¹ exhibits a marked antiviral activity against HDV (online supplementary table S3). In the same vein, nelfinavir, a protease inhibitor presenting antiretroviral activity³² was also identified in the drug screen (online supplementary table S3).

Given our discovery of ESR1 as HDV host-dependency factor, we next focused on ESR1-targeting agents. The library includes several agonists and antagonists of ESR1, as well as characterised targets for endocrine therapy in breast cancer.³³ Interestingly, the ESR1 antagonist fulvestrant exhibited a marked, significant and dose-dependent antiviral effect against HDV, whereas tamoxifen and toremifen, two ESR1 modulators with oestrogenic effects in the liver³⁴ increased HDV infection, validating the importance of ESR1 in HDV infection (figure 6B-C). Interestingly, a 48-hour treatment started after virus inoculation induced a marked decrease in HDV-infected cells (figure 5D), suggesting an effect on HDV replication.

Next, we aimed investigate the mechanism of action of the antiviral activity of fulvestrant by investigating a functional link of ESR1 and CAD suggested by protein/protein interaction studies.²⁷ To address this question, CAD expression was analysed in Huh-106 cells and PHH in the presence or absence of the ESR1 antagonist (figure 6E-G). As shown in figure 6G,

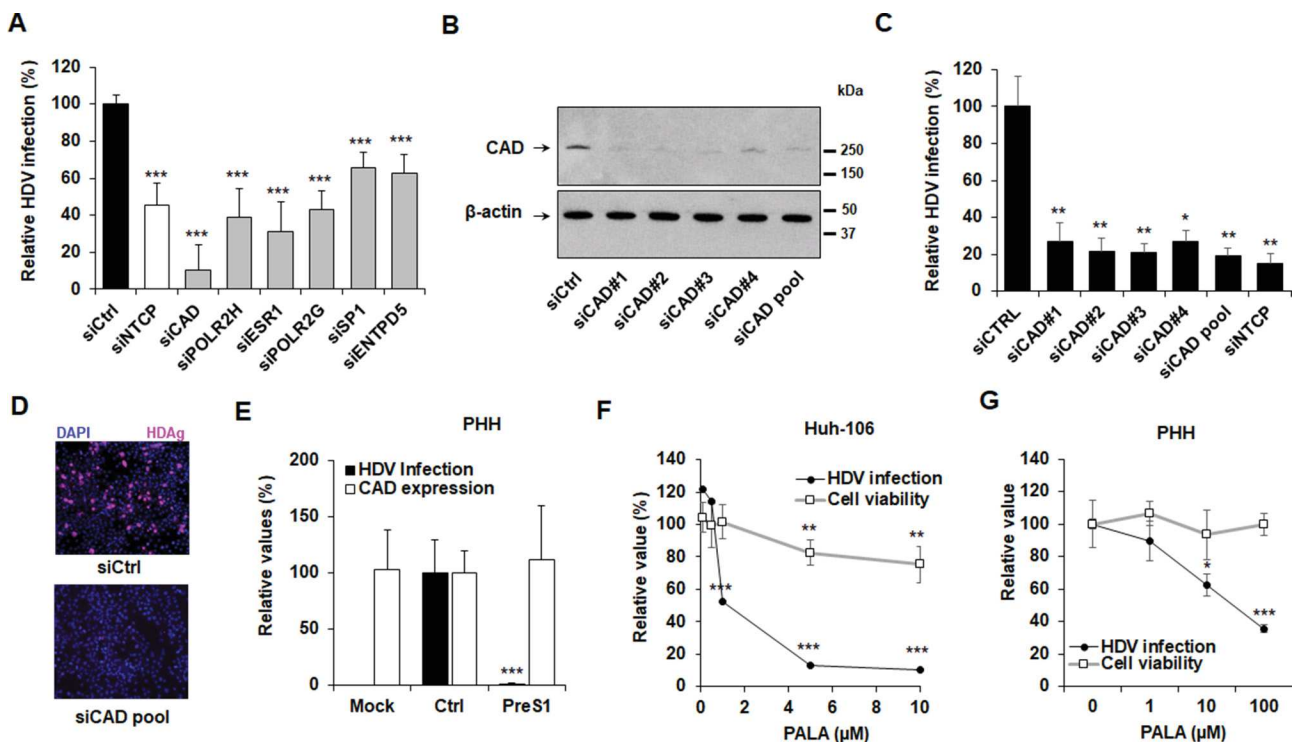


Figure 3 CAD is a key host factor required for HDV infection. (A) Functional validation of host factors belonging to the pyrimidine biosynthesis using perturbation studies. Results are presented as means \pm SD % HDV infection compared with control siRNA (siCtrl, set at 100%) from three independent screens ($n=9$, primary screen and two validation screens performed in triplicate). *** p value <0.001 (unpaired Student's t -test compared with siCtrl samples). (B–D) CAD is required for HDV infection. Huh-106 cells were reverse-transfected with four individual siRNAs targeting CAD mRNA or with the pool of four siRNAs. Silencing efficacy was assessed by western blot after 2 days. (B) One representative experiment is shown. Cells were then infected with HDV, and virus infection was assessed after 7 days by quantitative reverse transcription (qRT)-PCR. Results are expressed as means \pm SEM % HDV infection compared with siCtrl (set at 100%) from three independent experiments ($n=8$). (C) Alternatively, HDV infection was assessed by immunofluorescence (IF) using a patient-derived anti-HDAg antibody. (D) One representative experiment using the pool of siCAD is shown. (E) HDV infection has no effect on CAD expression in PHH. PHH were treated with preS1 peptide (preS1) or a peptide control (Ctrl) for 1 hour prior to infection with HDV for 7 days. Results are expressed as means \pm SD % HDV infection (assessed by HDV RNA levels) or CAD expression compared with control peptide-treated cells (Ctrl, set at 100%) from four independent experiments ($n=8$). (F–G) The CAD inhibitor PALA dose-dependently inhibits HDV infection in Huh-106 cells (F) and PHH (G). Cells were treated with PALA at the indicated concentrations 24 hours before infection with HDV. Cells were then cultured for 7 days in presence of PALA. HDV infection was assessed by qRT-PCR. Cell viability was assessed by Presto Blue. Results are expressed as means \pm SD % HDV infection or cell viability compared with untreated cells (0, set at 100%) from three independent experiments (Huh-106 [F], $n=9$) or as means \pm SEM % HDV infection or cell viability from three independent experiments (PHH [G], $n=8$). CAD, carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase and dihydroorotase; HDV, hepatitis D virus; PALA, N-(phosphonoacetyl)-L-aspartic acid; PHH, primary human hepatocyte.

fulvestrant treatment resulted in a loss of CAD protein expression in both Huh-106 cell line and PHH, suggesting that the antiviral activity of ESR1-inhibitor fulvestrant is mediated by ESR1-mediated downregulation of CAD expression, which in turn is required for HDV replication, confirming the previous observations with PALA.

Taken together, our dual screening approach uncovers the pyrimidine pathway and its associated and regulatory proteins as host factors for HDV infection and targets for antiviral therapy.

DISCUSSION

Chronic hepatitis D is the most severe form of viral hepatitis, and at present time, no treatment allows robust viral clearance. Using a dual screening approach, we identified *ESR1* and *CAD* as host factors and antiviral targets for HDV infection. The functional impact of the pyrimidine biosynthesis for HDV replication is corroborated by: (1) a marked decrease in HDV infection after *CAD* and *ESR1* silencing; (2) a significant antiviral effect of *CAD* and *ESR1* inhibitors PALA and fulvestrant;

and (3) kinetic experiments mapping viral replication as the step of the viral life cycle mediated by these host factors and targeted by the antiviral (4) validation studies in primary human hepatocytes.

Whereas the molecular virology of HDV is well described, the molecular interactions between the virus and liver host factors are still largely unknown.⁵ In mammalian cells, the pyrimidine biosynthesis pathway leads to the production of de novo nucleotides and plays a key role in RNA and DNA production, as well as protein glycosylation or cell membrane assembly.²⁵ Moreover, uridine nucleotides and derivatives regulate key physiological processes, such as lipid metabolism, regulation of normal central nervous system activity or modulation of reproduction,³⁵ making this pathway a major actor of important metabolic processes. As a source of nucleotides for HDV RNA, this pathway is likely to be required for optimal virus replication. Moreover, as a key regulator of viral glycosylation,²⁵ an alteration of this pathway may alter post-translational modification of host or viral proteins, disrupting viral infection.

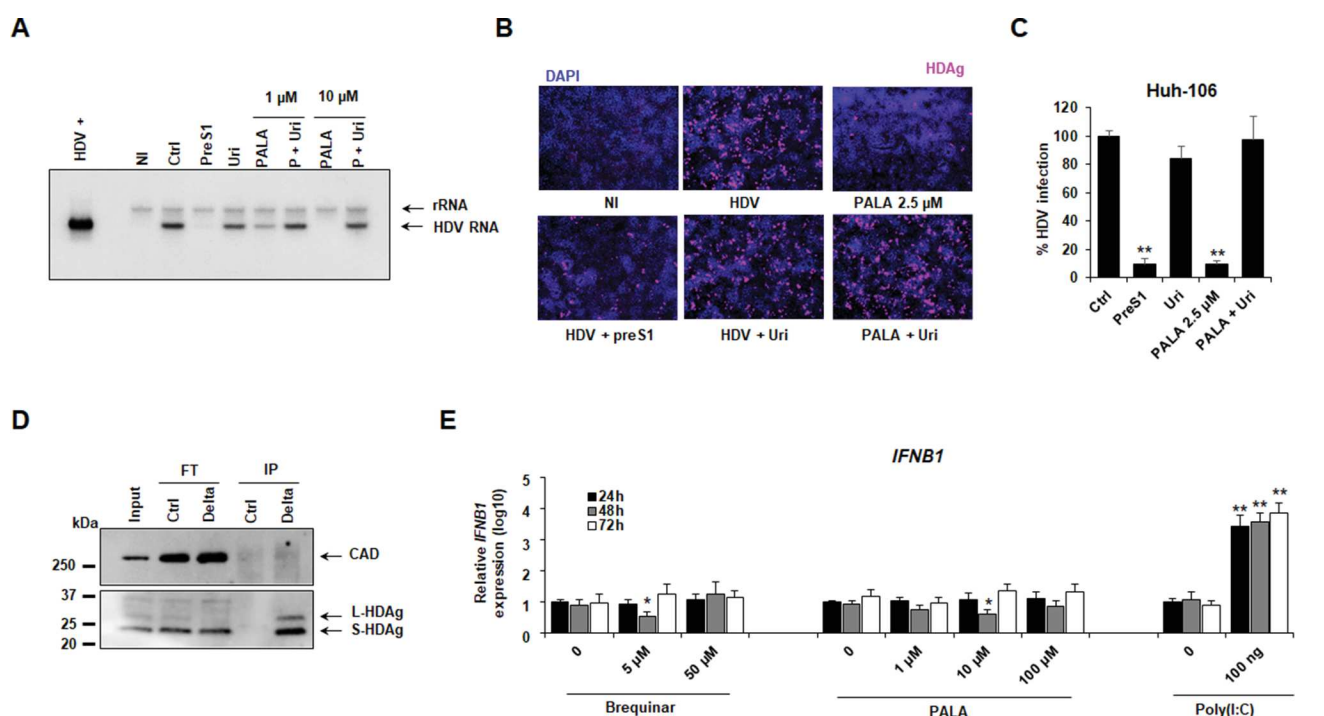


Figure 4 Characterisation of CAD–HDV functional interaction. (A–C) Uridine complementation restores HDV infection in PALA-treated cells. Huh-106 cells were treated with PALA (1 μ M or 10 μ M) in presence or absence of 30 μ M uridine 24 hours prior to infection with HDV, and compound treatment was maintained for 7 days. HDV infection was assessed by northern blot (A). HDV+ corresponds to approximately 5.10^7 HDV RNA genome equivalents extracted from HDV particles produced in Huh7 cells. rRNA corresponds to ribosomal RNA. One representative experiment is shown. Alternatively, Huh-106 cells were treated with PALA 2.5 μ M in presence or absence of 30 μ M uridine. HDV infection was assessed after 7 days by IF (B) or qRT-PCR (C). Results are expressed as means \pm SEM % HDV infection compared with HDV-infected untreated cells (Ctrl, set at 100%) from three independent experiments (n=6). (D) Absent direct interaction between HDV antigens and CAD. Huh-106 were transfected with pSVL(D3) plasmid encoding the HDV genome. Three days after transfection, cells were lysed, and HDV-specific co-immunoprecipitation (co-IP) was performed using an anti-HDAg antibody (Delta) or with a control antibody (Ctrl). HDV antigens and CAD expression in the original cell lysate (input), in Flow-through control samples (FT) and in IP eluates (IP) were assessed by western blot. One experiment is shown. (E) No IFN induction after inhibition of pyrimidine biosynthesis in Huh-106 cells. Huh-106 cells were treated with Brequinar or PALA at the indicated concentrations. Alternatively, Huh-106 cells were reverse-transfected with Poly(I:C) (100 ng). Cells were then lysed every day for 3 days, and *IFNB1* expression was assessed by qRT-PCR. Results are expressed as means \pm SD relative *IFNB1* expression (log10) compared with untreated or non-transfected cells (0, all set at 1) from three independent experiments (n=6). CAD, carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase and dihydroorotase; HDV, hepatitis D virus; PALA, N-(phosphonoacetyl)-L-aspartic acid.

CAD is a multifunctional enzyme exhibiting carbamoylphosphate synthetase, aspartate transcarbamylase and dihydroorotase activities catalysing the three first steps of the pyrimidine biosynthesis pathway,³⁶ playing a key role in HDV infection as such. The observed antiviral activity of the CAD-specific inhibitor PALA validates the importance of this factor and pathway in HDV infection. It is of interest to note that another enzyme of the pyrimidine biosynthesis pathway DHODH, which catalyses the production of orotate from DHO, has been described as an antiviral target by small molecule GSK983.³⁷ Here, we confirmed that the CAD-mediated DHO and uridine starvation is responsible for the observed antiviral effect (figures 4 and 5). Interestingly, HSPG synthesis has been shown to be dependent on the pyrimidine synthesis pathway in a CAD-defective animal model.³⁸ However, we did not observe any effect of CAD inhibition on either HBV infection or HDV entry (figure 5E–H). While recent studies have suggested that the inhibition of pyrimidine biosynthesis can stimulate innate antiviral responses,²⁹ no induction of IFN expression was observed in our model (figure 4E). Thus, it is likely that the modulation of CAD activity or expression affects HDV infection through its classical enzymatic activity linked to pyrimidine metabolism, mainly affecting viral replication through uridine starvation, affecting both genomic

and antigenomic HDV RNAs. In this context, our study suggests that the first steps of replication are particularly susceptible to PALA. These results are consistent with the timing of HDV RNA amplification, much more pronounced during the early phase of replication, before L-HDAg-mediated slowdown of replication.⁵

Among the genes regulating the pyrimidine pathway, we identified *ESR1* as a HDV host-dependency factor and antiviral target. *ESR1* is a nuclear hormone receptor expressed in the mammary gland and female reproductive track and also in lung and liver.³⁹ In our mechanistic analyses, we show that *ESR1* inhibition by fulvestrant led to a decrease in CAD protein expression, which most likely explains the antiviral effect of the molecule.

Our screening strategy also identified small molecules exhibiting significant antiviral activity against HDV infection. Among them was found ribavirin, a nucleoside analogue previously used for the treatment of chronic HCV infection.⁴⁰ Given its concentration in the primary screen (10 μ M), HDV inhibition is most likely due to the ability of ribavirin to inhibit de novo synthesis of GTP as recently suggested as a possible mechanism for the inhibition of hepatitis E virus (HEV) replication in Huh7 cells (IC₅₀ of 18.9 μ M for GTP depletion; EC₅₀ of 3 μ M for HEV replication⁴¹). However, clinical attempts to treat hepatitis D using ribavirin were largely unsuccessful.⁴

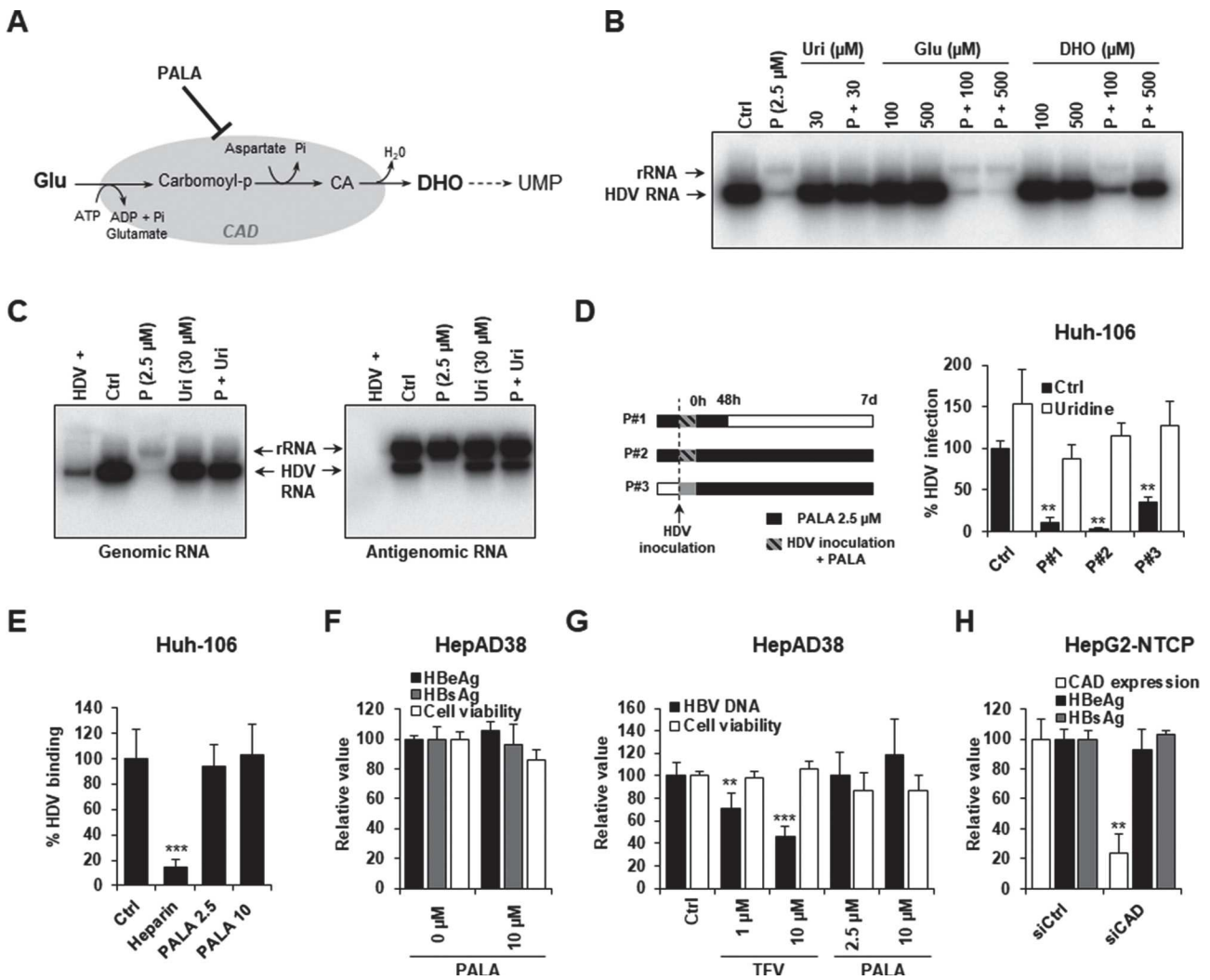


Figure 5 PALA specifically inhibits HDV replication by targeting CAD biological function. (A) Schematic representation of reactions catalysed by CAD enzyme. (B) DHO treatment restores HDV infection in PALA-treated cells. Huh-106 cells were treated with PALA 2.5 μM and infected with HDV in presence or absence of L-glutamine (Glu) or DHO at the indicated concentrations. Infection was assessed after 7 days by northern blot detection of HDV genomic RNA. rRNA corresponds to ribosomal RNA. One experiment is shown. (C) PALA inhibits both HDV genomic and antigenomic production. Huh-106 cells were treated with PALA 2.5 μM 24 hours prior to infection with HDV. HDV genomic and antigenomic RNAs were detected by northern blot using specific probes 7 days after infection. HDV+ corresponds to approximately 5.10⁷ HDV RNA genome equivalents extracted from HDV particles produced in Huh7 cells. One experiment is shown. (D) Kinetics of HDV infection by PALA. Huh-106 cells were pretreated with PALA at 2.5 μM and infected with HDV (conditions P#1 and P#2). Cells were then cultured in presence of PALA for 48 hours (P#1) or for 7 days (P#2) in presence or absence of uridine (30 μM). Alternatively, Huh-106 cells were infected with HDV with no PALA pretreatment (P#3). Sixteen hours after viral inoculation, cells were cultured in presence of PALA 2.5 μM with or without uridine (30 μM). HDV infection was assessed after 7 days by qRT-PCR. Results are expressed as means ± SEM % HDV infection compared with HDV-infected untreated cells (Ctrl, set at 100%) from three independent experiments (n=6). (E) PALA does not affect HDV binding. Huh-106 cells were cultured for 24 hours at 16°C in presence of HDV particles, which were pretreated or not with heparin (30 μg/mL). HDV binding was measured by qRT-PCR quantification of total HDV RNA bound to cells after 24 hours. Results are expressed as means ± SD % HDV binding relative to control untreated cells (Ctrl, set at 100%) from three independent experiments (n=9). (F–H) CAD inhibition or silencing does not affect HBV infection and replication. (F) HBV-producing HepAD38 cells were treated with PALA (10 μM) for 3 days. HBeAg and HBsAg secretion in culture supernatant was then quantified by chemiluminescent immunoassay (CLIA). Cell viability was assessed by Presto Blue. Results are expressed as means ± SEM % HBeAg production, HBsAg production or cell viability compared with untreated cells (0 μM, all set at 100%) from three independent experiments (n=6). (G) HepAD38 cells were treated with either tenofovir (TFV) or PALA at the indicated concentrations for 3 days. HBV replication was assessed by quantification of HBV DNA copies in the supernatant of treated cells by qPCR. Results are expressed as means ± SD % HBV DNA in the supernatant or cell viability compared with untreated cells (Ctrl, all set at 100%) from three independent experiments (n=9). (H) HepG2-NTCP cells were reverse-transfected with siCAD or siCtrl for 2 days prior to infection with HBV. HBV infection was assessed after 10 days by quantification of HBeAg and HBsAg production using chemiluminescent immunoassay (CLIA). Results are expressed as means ± SD % CAD expression, HBeAg production or HBsAg production compared with siCtrl-transfected cells (siCtrl, all set at 100%) from three independent experiments (n=6). CA, Carbamoyl aspartic acid; CAD, carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase and dihydroorotase; DHO: dihydroorotate; Glu, glutamine; HBV, hepatitis B virus; HDV, hepatitis D virus; PALA, N-(phosphonoacetyl)-L-aspartic acid; Pi, inorganic phosphate; UMP, uridine monophosphate.

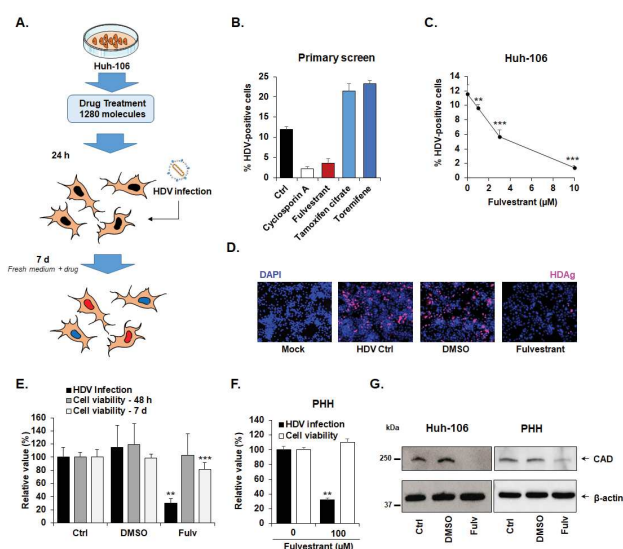


Figure 6 ESR1 inhibitor fulvestrant inhibits HDV replication by suppression of CAD expression. (A) Small molecule screen flow chart. Huh-106 cells were treated with individual compounds belonging to the Prestwick chemical library (10 μM) 1 day prior to infection with HDV. Infection was assessed after 7 days by immunofluorescence. Every compound was tested in triplicate. (B). ESR1 modulators affect HDV infection. From the primary screen, fulvestrant (an ESR1 inhibitor) from the one hand, and tamoxifen and toremifen from the other hand (two agonists/modulators of ESR1) exhibited antiviral or proviral activity against HDV, respectively. Results are presented as means ± SD % HDV infected cells (n=3). (C). Fulvestrant dose-dependently inhibits HDV infection. Huh-106 cells were treated with fulvestrant at the indicated concentrations and then infected with HDV for 7 days. Results are expressed as means ± SD % HDV infected cells from three independent experiments (n=9). (D) Short fulvestrant treatment for 48 hours following virus inoculation inhibits HDV infection. Huh-106 cells were infected with HDV and then treated with fulvestrant (10 μM) or dimethyl sulfoxide (DMSO) for 48 hours. Cells were then cultured in absence of drug and infection was assessed after 7 days by IF. One representative experiment is shown. (E) Fulvestrant antiviral activity is associated with slight cytotoxicity. Cell viability was assessed after 48 hours and after 7 days by Presto blue. HDV infection was assessed after 7 days by qRT-PCR. Results are expressed as means ± SD % HDV infection (HDV RNA) or cell viability compared with untreated HDV-infected cells (Ctrl, set at 100%) from three independent experiments (n=9). (F) Fulvestrant antiviral activity in PHH. PHH were infected with HDV, and then treated with fulvestrant for 48 hours at the indicated concentrations. Results are expressed as means ± SD % HDV infection (HDV RNA) or cell viability compared with untreated HDV-infected PHH (Ctrl, set at 100%) from two independent experiments (n=6). (G) Fulvestrant inhibits CAD expression. Huh-106 cells and PHH were treated with fulvestrant (Fulv, 10 μM) or DMSO for 72 hours. CAD expression was assessed by western blot. CAD, carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase and dihydroorotase; HDV, hepatitis D virus; ESR1, estrogen receptor 1; PHH, primary human hepatocyte.

Collectively, we identified previously undiscovered pathways and host factors for HDV infection and antiviral targets. Host-targeting agents are a promising approach for the development of new antiviral treatments, notably because they limit the emergence of resistant variants.^{8–10, 42} In particular for RNA viruses, which do not integrate into the genome, host-targeting agents hold promise for viral cure.⁴³ Indeed, in chronic HCV infection antibodies targeting a viral host entry factor claudin-1 cure viral

infection in a state-of-the-art mouse model,¹² and a miRNA-122 antagonist has been shown to cure chronic HCV infection in monotherapy in a subset of patients.⁴⁴ Two host compounds targeting HDV factors have been developed up to clinical proof of concept: these include Myrcludex B, a small peptide-targeting HBV/HDV entry factor NTCP and the prenylation inhibitor Ionafrinib.^{4, 13, 14} In randomised clinical trials, both compounds demonstrated a significant and robust antiviral effect in chronically infected patients,^{4, 13, 14} supporting the validity of the concept of host-targeting antivirals for HDV infection. However, long-term safety, potential resistance in subsets of patients and data on sustained virological response remain to be determined. The discovery of novel host factors described in this study may overcome these limitations by complementary, safer and more efficient approaches. Compounds targeting essential host factors of the viral replication step may be conceptually superior to entry or prenylation inhibitors by targeting the most vulnerable step of the viral life cycle. Indeed, viral replication is the target of many effective clinically licenced antiviral therapies such as nucleoside analogues for HBV infection or polymerase/protease inhibitors for HIV and HCV infection.

A theoretical disadvantage of HTA is their putative adverse effects on physiological processes mediated by the host factors. In this context, given that an HDV treatment will occur in a context of diseased liver, assessment of safety will be a major parameter in development. In this regard, it is of interest to note that pyrimidine synthesis inhibitors, such as leflunomide or teriflunomide, are currently used for the treatment of rheumatoid arthritis and multiple sclerosis.^{45, 46} The safety profile of these compounds suggests that pyrimidine biosynthesis is a targetable pathway for antiviral strategies. Indeed, the FDA-approved leflunomide, targeting DHODH, induces uridine starvation at concentrations similar to PALA concentrations we used in this study (0–100 μM).⁴⁷ Although detailed toxicity analyses in animal model and human tissues will be required to assess the therapeutic window of PALA, the dose–response effects of leflunomide suggests that PALA doses required to inhibit HDV infection are most likely in a range that will have an acceptable clinical safety profile.

In conclusion, by uncovering key host factors for HDV infection our results significantly improve the understanding of the HDV life cycle and contribute to the development of novel antiviral strategies for HDV cure.

MATERIAL AND METHODS

Human subjects

Human serum from patients with chronic HBV/HDV infection followed at the Strasbourg University Hospitals, Strasbourg, France, was obtained with informed consent. PHHs were obtained from liver tissue from patients undergoing liver resection for liver metastasis at the Strasbourg University Hospitals with informed consent.

Cell lines and human hepatocytes

Huh-106,⁷ HepAD38⁷ and HepG2-NTCP⁷ cells have been described. PHHs were isolated and cultured as described.⁴⁸

Key reagents

Fulvestrant (I4409), DL-dihydroorotic acid (DHO, D7003), L-glutamine (59202C), uridine (U3003) and TFV (1643601) were purchased from Sigma-Aldrich (Merck). Sparfocid acid (L-Aspartic acid, N-(phosphonoacetyl)-, disodium salt (9CI) or PALA, NSC: 224131) was first obtained from the Drug Synthesis

and Chemistry Branch, Developmental Therapeutics Program, Division of Cancer Treatment and Diagnosis, National Cancer Institute, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA. For further analyses, PALA was synthesised at the Institute of Chemistry, University of Strasbourg, as described in online supplementary material and methods. PreS1 peptide was synthesised by Bachem.⁷

HDV and HBV production and infection

The production of recombinant HDV and HBV infectious virus as well as the protocol for HDV infection of Huh-106 cells and PHHs and for HBV infection of HepG2-NTCP cells have been described.^{7,49,50} A detailed protocol is presented in online supplementary material and methods.

RNAi loss-of-function and small molecule screens

Screening was performed at the High Throughput Screening platform of the Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire in Illkirch, France. The Human ON-TARGETplus ‘Druggable Genome’ siRNA Library was used for gene expression silencing. For the small molecule screen, the Chemical Library (PCL) containing 1280 FDA-approved molecules was obtained from Prestwick. Detailed information about both screening strategies as well as the algorithm for selection of HDV-dependency candidates are presented in online supplementary material and methods.

Validation of CAD as a HDV host factor using individual siRNAs

Huh-106 cells were reverse-transfected with the four individual siRNAs from the siCAD pool, a pool of siRNA targeting SLC10A1 (siNTCP) or a non-targeting siRNA control (siCtrl) using lipofectamin RNAi max as described.^{7,50} Gene expression was assessed, 2 days after transfection, by western blot detection of CAD protein using a rabbit monoclonal anti-CAD antibody (Abcam ab40800) as previously described.^{7,50} β -actin expression was assessed as a loading control using a mouse monoclonal anti- β -actin antibody (Sigma, A5441). Two days after transfection, cells were infected by HDV, and infection was assessed after 7 days as described in online supplementary material and methods.

Statistical analysis

All experiments were performed at least twice in an independent manner. Statistical analyses were performed using a two-tailed Mann-Whitney U test unless otherwise stated; $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***) were considered statistically significant. Significant p values are indicated by asterisks in the individual figures and figure legends. The number of biological replicates is indicated in the figure legends (n).

Additional methodological information are available in online supplementary material.

Acknowledgements We would like to thank J Taylor (Fox Chase Cancer Center) for the gift of the HDV expression plasmid (pSVL(D3)) and our colleagues S Durand and M Renaud for excellent technical support. We thank the INGESTEM infrastructure for access to the IGBMC high-throughput high-content screening workstation.

Contributors TB initiated the study. TB and ERV designed and supervised research. ERV, AW, LB and TB set up, designed and performed the siRNA and small molecule screens. TG and PPa produced the sparfosic acid. ERV, CB, LH, VT-L and EC performed the validation experiments. CSu performed the HDV northern blots. PPe provided human hepatocytes. ERV, AW, CB, LH, EC, MBZ, CSu, CSc, LB and TB analysed the data. ERV, HES and AK performed the bioinformatical analyses of the screens. EV and TB wrote the manuscript. All the authors approved the study.

Funding This work was supported by Inserm, the University of Strasbourg, the European Union (Infect-ERA hepBccc, ERC-2014-AdG-671231-HEPCIR and Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement 667273 - HEPCAR), Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les Hépatites Virales (ANRS 15/1099) and the French Cancer Agency (ARC IHU201301187). This work has been published under the framework of the LabEx ANR-10-LAB-28 and benefits from a funding from the state managed by the French National Research Agency as part of the Investments for the Future (Investissements d’Avenir) programme. ERV is the recipient of an ANRS fellowship (ECTZ50121).

Competing interests None declared.

Ethics approval Protocols were approved by the local Ethics Committee of the Strasbourg University Hospitals (CPP) and the Ministry of Higher Education and Research of France (DC 2016 2616).

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Data sharing statement The datasets generated in this study, including the results from both RNAi and small molecule primary screens, are available within online supplementary material files. The rest of the data are available from the corresponding authors on reasonable request.

Open access This is an open access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited, appropriate credit is given, any changes made indicated, and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

ORCID iDs

Patrick Pessaix <http://orcid.org/0000-0001-5635-7437>

Thomas F Baumert <http://orcid.org/0000-0002-9022-5611>

REFERENCES

- Taylor JM. Virology of hepatitis D virus. *Semin Liver Dis* 2012;32:195–200.
- Fattovich G, Giustina G, Christensen E, et al. Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. The European concerted action on viral hepatitis (Eurohep). *Gut* 2000;46:420–6.
- Hughes SA, Wedemeyer H, Harrison PM. Hepatitis delta virus. *The Lancet* 2011;378:73–85.
- Rizzetto M. Investigational drugs in development for Hepatitis D. *Expert Opin Investig Drugs* 2017;26:999–1005.
- Sureau C, Negro F. The hepatitis delta virus: replication and pathogenesis. *J Hepatol* 2016;64:5102–16.
- Webb CT, Lupták A. Kinetic parameters of trans scission by extended hdv-like ribozymes and the prospect for the discovery of genomic trans-cleaving RNAs. *Biochemistry* 2018;57:1440–50.
- Verrier ER, Colpitts CC, Bach C, et al. A targeted functional RNA interference screen uncovers glypican 5 as an entry factor for hepatitis B and D viruses. *Hepatology* 2016;63:35–48.
- Verrier ER, Colpitts CC, Sureau C, et al. Hepatitis B virus receptors and molecular drug targets. *Hepatology Int* 2016;10:567–73.
- Baumert TF, Verrier ER, Nassal M, et al. Host-targeting agents for treatment of hepatitis B virus infection. *Curr Opin Virol* 2015;14:41–6.
- Colpitts CC, Verrier ER, Baumert TF. Targeting viral entry for treatment of Hepatitis B and C virus infections. *ACS Infect Dis* 2015;1:420–7.
- Harak C, Meyrath M, Romero-Brey I, et al. Tuning a cellular lipid kinase activity adapts hepatitis C virus to replication in cell culture. *Nat Microbiol* 2016;2:16247.
- Mailly L, Xiao F, Lupberger J, et al. Clearance of persistent hepatitis C virus infection in humanized mice using a claudin-1-targeting monoclonal antibody. *Nat Biotechnol* 2015;33:549–54.
- Koh C, Canini L, Dahari H, et al. Oral prenylation inhibition with Ionafarnib in chronic hepatitis D infection: a proof-of-concept randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2A trial. *Lancet Infect Dis* 2015;15:1167–74.
- Bogomolov P, Alexandrov A, Voronkova N, et al. Treatment of chronic hepatitis D with the entry inhibitor myrcludex B: first results of a phase Ib/IIa study. *J Hepatol* 2016;65:490–8.
- Li Q, Brass AL, Ng A, et al. A genome-wide genetic screen for host factors required for hepatitis C virus propagation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:16410–5.
- Brass AL, Dykxhoorn DM, Benita Y, et al. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* 2008;319:921–6.
- Busse-Wicher M, Wicher KB, Kusche-Gullberg M. The exostosin family: proteins with many functions. *Matrix Biol* 2014;35:25–33.
- Sharma N, Kumari R. Rpb4 and Rpb7: multifunctional subunits of RNA polymerase II. *Crit Rev Microbiol* 2013;39:362–72.
- Hull MW, McKune K, Woychik NA. RNA polymerase II subunit RPB9 is required for accurate start site selection. *Genes Dev* 1995;9:481–90.
- Kraus RJ, Yu X, Cordes BA, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α plays roles in Epstein-Barr virus’s natural life cycle and tumorigenesis by inducing lytic infection

- through direct binding to the immediate-early BZLF1 gene promoter. *PLoS Pathog* 2017;13:e1006404.
- 21 Morinet F, Parent M, Pillet S, et al. Hypoxia inducible factor one alpha and human viral pathogens. *Curr Res Transl Med* 2017;65:7–9.
 - 22 Chiu DK, Tse AP, Xu IM, et al. Hypoxia inducible factor HIF-1 promotes myeloid-derived suppressor cells accumulation through ENTPD2/CD39L1 in hepatocellular carcinoma. *Nat Commun* 2015;8:517.
 - 23 Luo D, Wang Z, Wu J, et al. The Role of Hypoxia Inducible Factor-1 in Hepatocellular Carcinoma. *Biomed Res Int* 2014;2014:1–11.
 - 24 Lin D, Wu J. Hypoxia inducible factor in hepatocellular carcinoma: a therapeutic target. *World J Gastroenterol* 2015;21:12171–8.
 - 25 Evans DR, Guy HI. Mammalian pyrimidine biosynthesis: fresh insights into an ancient pathway. *J Biol Chem* 2004;279:33035–8.
 - 26 Löffler M, Fairbanks LD, Zameitat E, et al. Pyrimidine pathways in health and disease. *Trends Mol Med* 2005;11:430–7.
 - 27 Wang Y, Wang Z, Liu T, et al. Effects of flanking regions on HDV cotranscriptional folding kinetics. *RNA* 2018;24:1229–40.
 - 28 Swyryd EA, Seaver SS, Stark GR. N-(phosphonacetyl)-L-aspartate, a potent transition state analog inhibitor of aspartate transcarbamylase, blocks proliferation of mammalian cells in culture. *J Biol Chem* 1974;249:6945–50.
 - 29 Lucas-Hourani M, Dauzonne D, Jorda P, et al. Inhibition of pyrimidine biosynthesis pathway suppresses viral growth through innate immunity. *PLoS Pathog* 2013;9:e1003678.
 - 30 Reyes GR. Ribavirin: recent insights into antiviral mechanisms of action. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2001;4:651–6.
 - 31 Sulkowski MS, Cooper C, Hunyady B, et al. Management of adverse effects of Peg-IFN and ribavirin therapy for hepatitis C. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;8:212–23.
 - 32 Perry CM, Frampton JE, McCormack PL, et al. Nelfinavir: a review of its use in the management of HIV infection. *Drugs* 2005;65:2209–44.
 - 33 Jeselsohn R, Buchwalter G, De Angelis C, et al. ESR1 mutations—a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2015;12:573–83.
 - 34 Ellmén J, Hakulinen P, Partanen A, et al. Estrogenic effects of toremifene and tamoxifen in postmenopausal breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2003;82:103–11.
 - 35 Connolly GP, Duley JA. Uridine and its nucleotides: biological actions, therapeutic potentials. *Trends Pharmacol Sci* 1999;20:218–25.
 - 36 Lee L, Kelly RE, Pastra-Landis SC, et al. Oligomeric structure of the multifunctional protein CAD that initiates pyrimidine biosynthesis in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:6802–6.
 - 37 Deans RM, Morgens DW, Ökesli A, et al. Parallel shRNA and CRISPR-Cas9 screens enable antiviral drug target identification. *Nat Chem Biol* 2016;12:361–6.
 - 38 Franks DM, Izumikawa T, Kitagawa H, et al. C. elegans pharyngeal morphogenesis requires both de novo synthesis of pyrimidines and synthesis of heparan sulfate proteoglycans. *Dev Biol* 2006;296:409–20.
 - 39 Droog M, Mensink M, Zwart W. The estrogen receptor α -cistrome beyond breast cancer. *Mol Endocrinol* 2016;30:1046–58.
 - 40 Loustaud-Ratti V, Debette-Gratien M, Jacques J, et al. Ribavirin: past, present and future. *World J Hepatol* 2016;8:123–30.
 - 41 Debing Y, Emerson SU, Wang Y, et al. Ribavirin inhibits in vitro hepatitis E virus replication through depletion of cellular GTP pools and is moderately synergistic with alpha interferon. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:267–73.
 - 42 Levrero M, Testoni B, Zoulim F. HBV cure: why, how, when? *Curr Opin Virol* 2016;18:135–43.
 - 43 Zeisel MB, Baumert TF. Clinical development of hepatitis C virus host-targeting agents. *Lancet* 2017;389:674–5.
 - 44 van der Ree MH, de Vree JM, Stelma F, et al. Safety, tolerability, and antiviral effect of RG-101 in patients with chronic hepatitis C: a phase 1B, double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2017;389:709–17.
 - 45 Zhang C, Chu M. Leflunomide: a promising drug with good antitumor potential. *Biochem Biophys Res Commun* 2018;496:726–30.
 - 46 Bar-Or A, Pachner A, Menguy-Vacheron F, et al. Teriflunomide and its mechanism of action in multiple sclerosis. *Drugs* 2014;74:659–74.
 - 47 Baumann P, Mandl-Weber S, Volkl A, et al. Dihydroorotate dehydrogenase inhibitor A771726 (leflunomide) induces apoptosis and diminishes proliferation of multiple myeloma cells. *Mol Cancer Ther* 2009;8:366–75.
 - 48 Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, et al. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med* 2011;17:589–95.
 - 49 Verrier ER, Yim SA, Heydmann L, et al. Hepatitis B virus evasion from cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate synthase sensing in human Hepatocytes. *Hepatology* 2018;68:1695–709.
 - 50 Verrier ER, Colpitts CC, Bach C, et al. Solute Carrier Ntcp Regulates innate antiviral immune responses targeting Hepatitis C virus infection of hepatocytes. *Cell Rep* 2016;17:1357–68.

**Annexe 3 : Turon-Lagot
et al., Virologie, 2019**

Virus de l'hépatite D : cycle viral et nouvelles stratégies thérapeutiques

Vincent Turon-Lagot
Antonio Saviano
Catherine Schuster
Éloi R. Verrier

Université de Strasbourg, Inserm,
Institut de recherche sur les maladies
virales et hépatiques UMR_S1110,
F-67000 Strasbourg, France

Résumé. De récentes estimations suggèrent qu'environ 70 millions de personnes sont infectées par le virus de l'hépatite D (ou delta, HDV). HDV est un petit virus satellite du virus de l'hépatite B (HBV) capable d'achever son cycle viral uniquement en présence de ce dernier. L'hépatite D est la forme la plus sévère d'hépatite virale chronique. Elle est responsable d'une aggravation et d'une accélération de la progression de la maladie hépatique, en comparaison des patients mono-infectés par le HBV. Les traitements actuels, basés sur l'interféron pégylé sont peu efficaces et ne permettent que rarement l'élimination définitive du virus. L'absence d'un modèle d'étude simple à long terme enfraint la compréhension des interactions HDV-hépatocytes, et notamment l'identification de facteurs hépatiques impliqués dans le cycle viral. Ces facteurs sont des cibles d'intérêt pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dont certaines sont en cours d'essai clinique. Cette revue résume les connaissances actuelles de la virologie moléculaire du HDV et fait le point sur les nouvelles solutions thérapeutiques en cours de développement.

Mots clés : HDV, virus hépatiques, stratégies antivirales

Abstract. An estimated 70 million people are chronically infected with hepatitis D (delta) virus (HDV) worldwide. HDV is a small satellite virus of hepatitis B virus (HBV) requiring HBV for the completion of its cycle. Hepatitis D is the most severe form of chronic viral hepatitis. It is responsible for an acceleration and an aggravation of chronic liver disease compared to HBV mono-infected patients. Current treatments based on pegylated interferon rarely allow viral clearance in chronically infected patients. For long time, the absence of easy-to-use models has limited the knowledge on virus-host interactions. Notably, hepatocyte host factors involved in the viral life cycle remain largely unknown. These host factors are potential therapeutic targets for novel treatment strategies, including molecules currently evaluated in clinical trials. This review summarizes our knowledge on HDV molecular virology and innovative therapeutic strategies targeting hepatocyte host factors.

Key words: HDV, hepatotropic viruses, antiviral strategies

Introduction : épidémiologie

L'hépatite D ou delta est considérée comme la forme la plus sévère d'hépatite virale chronique. Identifié initialement chez des patients atteints d'hépatite B chronique (HBC) comme un nouvel antigène du virus de l'hépatite B (HBV pour *hepatitis B virus*) [1], l'agent pathogène responsable est un petit virus à ARN infectant exclusivement les

hépatocytes et nécessitant la présence de HBV pour achever son cycle répliatif [2, 3]. Identifié aujourd'hui comme le plus petit virus capable d'infecter les animaux, le virus de l'hépatite D (HDV pour *hepatitis D virus*) est responsable d'une accélération et d'une aggravation de la progression de la maladie hépatique chez les patients souffrant d'HBC [4], déjà première cause mondiale de carcinome hépatocellulaire [5]. Initialement, il était estimé que l'hépatite D touchait environ 5 % des patients chroniquement infectés par le HBV, soit entre 15 et 20 millions de patients dans le monde [4]. Une récente

Correspondance : E.R. Verrier
<e.verrier@unistra.fr>

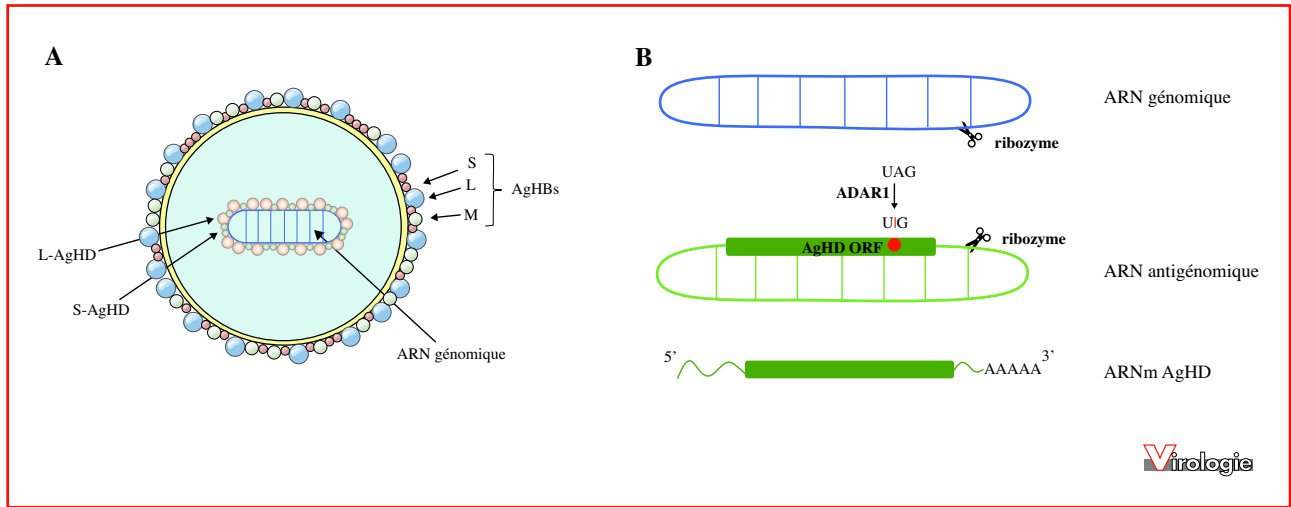


Figure 1. Structure du virus de l'hépatite D (HDV). (A) Représentation schématique de la particule virale du HDV. Le virion est composé d'une enveloppe lipidique dans laquelle sont enchâssées les trois formes des protéines d'enveloppe du virus de l'hépatite B (HBV) qui forment l'AgHBs (S, M et L). Le génome du HDV est composé d'un ARN simple brin circulaire à polarité négative entouré par les deux formes de l'antigène delta (L-AgHD et S-AgHD) formant le complexe ribonucléoprotéique. (B) Le génome du HDV est fortement apparié (> 70 % d'appariement) induisant une structure en bâtonnet. Il contient une séquence ribozyme qui catalyse la fragmentation des différentes unités de génome produites au cours de la réplication en cercles roulants. La transcription de l'ARN génomique permet la synthèse de deux ARNs différents : l'ARN antigénomique et l'ARNm AgHD. L'ARN antigénomique contient également une séquence ribozyme et permet la néosynthèse d'ARN génomique. Il contient également un site d'édition. L'enzyme ADAR1 catalyse la modification d'une adénosine (A) du codon stop de l'ORF S-AgHD en inosine (I). Cette édition de l'ARN induit la production de la seconde forme de AgHD, plus longue de 19 acides aminés.

méta-analyse présente une prévalence mondiale de 0,98 % inégalement répartie à travers le globe, correspondant à une prévalence de 10,58 % chez les patients HBV [6]. Même si les deux chiffres sont difficilement conciliables (de 62 millions à 27 millions de patients en fonction de l'approche), cette étude suggère un nombre de patients infectés par le HDV dans le monde bien plus important que les études précédentes. Certaines régions telles le bassin méditerranéen (27,8 % des patients atteints d'hépatite) [7], l'Afrique du Nord (20,7 % des patients atteints d'hépatite) [8] et l'Afrique centrale (38 % des patients atteints d'hépatite) [9] sont particulièrement touchées. En Europe et aux États-Unis, une majorité de patients infectés par le HDV sont des usagers de drogue injectable [6]. En dépit de la généralisation de la vaccination anti-HBV, la prévalence du HDV augmente dans les pays développés, ce rebond étant notamment dû à l'immigration depuis les régions endémiques mais également au manque de vigilance des populations à risque à l'égard des virus hépatiques [10].

À l'heure actuelle, aucun traitement ne permet efficacement d'éliminer le virus [4]. La recherche de nouvelles solutions thérapeutiques a longtemps été freinée par le manque de connaissances des interactions HDV-hépatocytes, en grande partie dû à l'absence de modèle d'étude simple. Des découvertes récentes sont à l'origine d'avancées significatives dans la compréhension du cycle viral, notamment dans

l'identification de nouveaux facteurs hépatiques impliqués dans le cycle viral, donnant lieu à l'émergence de nouvelles stratégies de traitement, dont certaines sont actuellement testées en essai clinique.

Virologie moléculaire du HDV

Structure des virions

Le HDV est un petit virus enveloppé satellite du HBV d'environ 35 nm de diamètre (figure 1) [2]. Il est caractérisé par la présence d'une enveloppe comportant les antigènes de surface du HBV (AgHBs), indispensables à la formation des particules virales, qui contient le génome viral circulaire associé aux deux formes de l'antigène delta (AgHD) formant un complexe ribonucléoprotéique (RNP) [2, 11]. Cet ARN circulaire de polarité négative permet l'expression d'ARNm codant pour les formes, courte (S-AgHD) et longue (L-AgHD) de l'antigène delta, toutes deux impliquées dans le cycle réplcatif et la formation de la RNP virale [4]. Cette structure très particulière lui confère une place à part dans la classification des virus, seul représentant du genre non classé des Deltavirus. Le HDV est décliné en 8 génotypes hétérogènes inégalement répartis sur l'ensemble du globe [12]. Si le génotype 1 est retrouvé dans le monde entier, les génotypes 5 et 8 prédo-

minent en Afrique. Les génotypes 2 et 4, associés à une maladie hépatique moins agressive [13] sont retrouvés en Extrême-Orient. Enfin, le génotype 3, associé à un risque accru d'insuffisance hépatique est principalement présent en Amérique du Sud [12, 13].

Origine du HDV : évolution depuis un viroïde de plante ou d'un ARN cellulaire ?

L'origine du HDV n'est à ce jour pas connue mais deux hypothèses majeures coexistent depuis une vingtaine d'années et proposent que HDV dérive soit de viroïdes de plantes soit d'un ARNm cellulaire.

Parmi les caractéristiques du génome du HDV, sa structure circulaire et son fort taux d'appariement (*figure 1B*) le rapprochent fortement des génomes de viroïdes de plante, petits ARN circulaires simple brin à haut potentiel répliatif, de taille cependant bien inférieure au génome du HDV, comprise entre 250 et 400 nucléotides [14-16]. Une autre différence notable est la présence sur l'antigénome du HDV d'un cadre ouvert de lecture codant pour l'antigène delta, alors que les génomes de viroïdes (à l'exception du scRYMV [17]) ne codent pour aucune protéine. En revanche, le mécanisme de répliation du génome, intégralement tributaire des ARN polymérases ADN dépendantes eucaryotes, est relativement similaire au mécanisme retrouvé chez certains viroïdes, comme les Avsunviroïdes [16]. Contrairement au HDV, les viroïdes de plantes ne s'assemblent pas en virions et se transmettent d'une plante à une autre par les graines ou des blessures, et aux cellules voisines au sein d'une plante infectée *via* les plasmodesmes [18]. Jusqu'à ce jour, aucune transmission active de cellule à cellule n'a été observée pour le HDV. Malgré tout, ces similitudes suggèrent que le HDV et les viroïdes pourraient descendre d'un même ancêtre commun, ou que l'un soit le précurseur de l'autre. L'hypothèse que le HDV provienne d'un viroïde ayant acquis une séquence codante lors de son évolution a été proposée en 1996 après la découverte dans le génome humain d'un gène codant pour une protéine interagissant avec l'antigène du virus (DIPA pour *delta-interacting protein A*) et présentant 60 % de similarité avec la séquence de la protéine virale [19]. De cette découverte, Brazas et Ganem ont émis l'hypothèse que le HDV dérive d'un ARN semblable à un viroïde ayant capturé la séquence codante pour la protéine DIPA à partir de l'ARNm cellulaire. D'autres travaux suggèrent que le HDV pourrait dériver d'un ARN cellulaire. Il y a une dizaine d'années, une étude démontra la présence d'une activité ribozyme dans la séquence de l'ARNm codant pour la *cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 3* (CPEB3) [20]. Ce ribozyme se trouve dans un intron de l'ARNm de *CPEB3* et s'apparente au ribozyme du HDV par sa structure et son activité biochimique. Le fait que ce

ribozyme ne soit présent que chez les mammifères a conduit les auteurs à émettre l'hypothèse que le génome du HDV pourrait dériver du transcriptome humain. L'un des arguments repose sur la mise en évidence des ARNs cellulaires circulaires (cARN) décrits dès le début des années 90 [21]. Ces cARN sont abondants et interviennent dans différents processus de régulation, comme la prolifération cellulaire et la progression cancéreuse, et interagissent notamment avec des microARN. Chaque cARN peut interagir avec plusieurs copies d'un même microARN et jouer ainsi un rôle d'« éponge » à microARN [22-24]. Toutefois, les cARN actuellement décrits ne comportent ni la séquence pouvant coder pour AgHD, ni l'activité ribozyme. De plus, la très récente description d'un virus partageant de nombreuses similarités avec le HDV chez les oiseaux, mais ne semblant pas dépendre d'un hépadnavirus pour l'achèvement de son cycle viral infirme l'hypothèse d'un HDV exclusivement humain [25].

Cycle viral du HDV

Les virions HDV et HBV partagent les mêmes protéines d'enveloppe ; aussi, le mécanisme d'entrée dans les hépatocytes est supposé identique pour les deux virus. Le cycle viral est initié par l'attachement de la particule virale à la surface des hépatocytes *via* son interaction avec les chaînes de sucres des protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG) [26], dont GPC5 [27] (*figure 2*). Il se lie ensuite de manière spécifique à son récepteur hépatocytaire, le transporteur d'acides biliaires NTCP (*sodium-taurocholate co-transporting polypeptide*), induisant l'entrée du virus dans la cellule [28]. Les 75 résidus myristoylés en N-terminal du domaine pré-S1 de la grande protéine d'enveloppe du HBV interagissent avec NTCP, potentiellement au niveau du site de liaison des acides biliaires [29, 30]. Un autre domaine du transporteur est impliqué dans l'entrée du virus mais sans interaction directe avec l'enveloppe virale, sa fonction dans l'entrée restant inconnue [28]. La liaison à NTCP induit l'endocytose de la particule virale selon un mécanisme encore inconnu. Le transport de la RNP du HDV du cytoplasme vers le noyau est également peu documenté, mais un signal NLS (signal de localisation nucléaire) a été identifié et caractérisé dans les deux formes d'AgHD [31].

Le génome du HDV ne codant pour aucune protéine non structurale, la répliation virale et la transcription de l'ARNm sont entièrement dépendantes des polymérases cellulaires. Le génome sert de matrice pour la transcription d'ARNm du HDV par l'ARN polymérase II. Une première forme d'ARNm est exportée dans le cytoplasme permettant la production de la forme courte S-AgHD. La protéine S-AgHD est importée dans le noyau et stimule la répliation virale [32], au cours de laquelle le génome

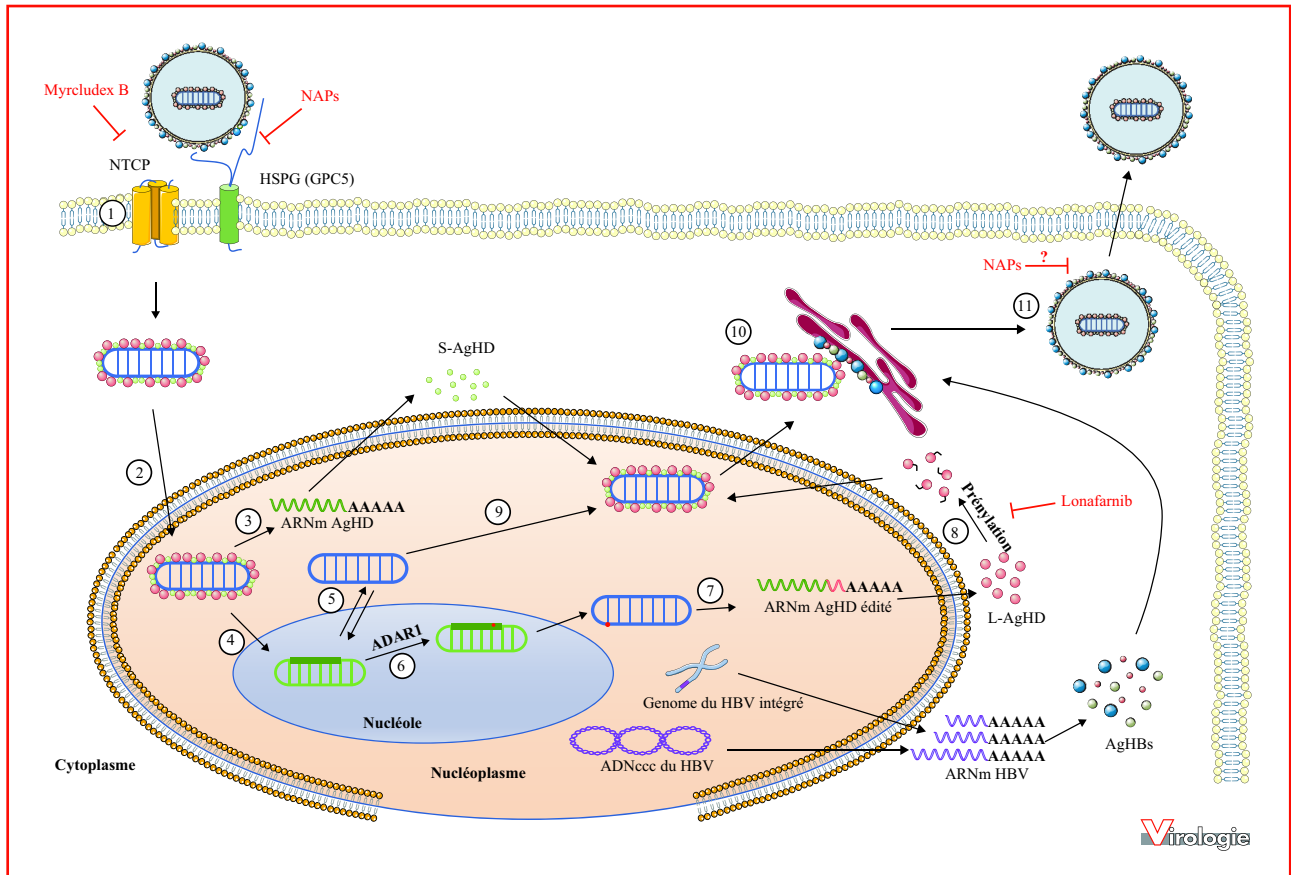


Figure 2. Cycle viral du HDV. (1) Le cycle viral débute par l'attachement aux protéoglycanes à sulfate d'héparane (HSPG), dont Glypican 5 (GPC5) à la surface des hépatocytes. La région pré-S1 de L-AgHBs se lie ensuite au récepteur spécifique du HBV et du HDV, le transporteur d'acides biliaires, NTCP. La particule virale est endocytée et la RNP virale est libérée dans le cytoplasme. (2) Elle est ensuite acheminée au noyau grâce au signal de localisation nucléaire présent sur les AgHD. (3) L'ARN polymérase II transcrit l'ARNm AgHD qui est ensuite exporté dans le cytoplasme où il est traduit pour produire la forme courte « Small » de AgHD (S-AgHD). (4) L'ARN polymérase II synthétise l'ARN antigénomique du HDV qui est ensuite transféré dans le nucléole. (5) Dans le nucléole, l'ARN antigénomique sert de matrice pour la néosynthèse d'ARN génomique par un mécanisme de cercle roulant. (6) L'ARN antigénomique est édité par l'action de l'enzyme ADAR1, supprimant le codon stop de l'ORF S-AgHD. (7) L'ARN antigénomique édité est transcrit en ARN génomique, induisant la synthèse de l'ARNm édité plus long. Ce dernier est exporté dans le cytoplasme où il est traduit en forme longue « Large » de AgHD (L-AgHD). (8) L-AgHD contient un site de prénylation qui est farnésylé par une farnésyltransférase cellulaire avant d'être transféré dans le noyau. (9) Les deux formes de AgHD interagissent avec les ARN génomiques néo-synthétisés afin de former de nouvelles ribonucléoprotéines virales qui sont exportées dans le cytoplasme. (10) Les ribonucléoprotéines virales interagissent, via une cystéine farnésylée de L-AgHD, avec la partie cytosolique de l'enveloppe du HBV au niveau du réticulum endoplasmique permettant leur enveloppement. (11) Les virions néoformés sont excrétés de la cellule infectée. Les différents antiviraux sont indiqués en rouge. L'hépatocyte représenté est également infecté par le HBV, indiqué par la présence l'ADNccc ou de son génome intégré (cycle complet non représenté).

du HDV recrute l'ARN polymérase II pour la synthèse de multimères d'ARN antigénomique par un mécanisme en cercle roulant [4]. L'activité ribozyme de l'antigénome catalyse l'auto-clivage des multimères en monomères, qui sont ensuite circularisés. L'ARN antigénomique du HDV sert ensuite de matrice à la synthèse de nouvelles copies de génome du HDV, également selon un mécanisme en cercle roulant via l'ARN polymérase II [4]. Bien que la réplication du HDV soit majoritairement portée par l'ARN polymérase II, plusieurs études suggèrent une implication des ARN polymérases I et III dans la synthèse de l'ARN

antigénomique [33, 34]. Il est généralement admis que la transcription des ARN génomiques et antigénomiques a lieu dans deux compartiments nucléaires différents. La transcription de l'ARN génomique a lieu dans le nucléoplasme et celle de l'ARN antigénomique se déroule dans le nucléole [35]. Durant la phase tardive de réplication, l'ARN antigénomique du HDV est édité via l'enzyme ADAR1 (*adenosine deaminase acting on RNA 1*), une adénosine du codon stop de S-AgHD étant transformée en inosine [4] ce qui conduira après réplication au remplacement du codon stop en codon tryptophane (figure 2). La nouvelle version

des ARN génomiques produits sert alors de matrice pour la transcription d'ARNm codant pour une forme plus longue, L-AgHD. Cette allongement C-terminale de 19 acides aminés contient notamment un signal d'export nucléaire (NES) [36] et un site de prénylation sur la cystéine 211 qui est farnésylée *via* une farnésyltransférase cellulaire après traduction [37, 38]. L-AgHD farnésylé est transféré dans le noyau et inhibe la réplication virale, ce qui a pour conséquence d'orienter le cycle viral vers l'assemblage de nouveaux virions [39]. L'ARN génomique néoformé s'associe avec S-AgHD et L-AgHD afin de former de nouvelles RNP qui sont ensuite exportées du noyau, grâce au NES de L-AgHD, par la voie TAP/Aly [40]. La cystéine farnésylée de L-AgHD permet l'interaction des RNP virales avec la partie cytosolique de AgHBs à la membrane du réticulum endoplasmique. L'interaction entre la RNP virale et AgHBs induit l'enveloppement des nouveaux virions ainsi que leur sécrétion, selon des voies encore inconnues [41]. HDV est donc tributaire de l'expression d'AgHBs pour achever son cycle viral. Au sein d'un hépatocyte préalablement infecté par le HBV, AgHBs peut être exprimé à partir de l'ADNccc du HBV mais aussi d'une version intégrée du génome viral dans le génome de la cellule hôte (*figure 2*). La réplication active du HBV ne semble en effet pas indispensable à la production de virions HDV [42].

Si les grandes étapes du cycle sont à présent bien décrites, de nombreuses zones d'ombre persistent quant aux interactions moléculaires entre HDV et facteurs hépatiques dont le virus dépend fortement pour l'achèvement de son cycle répliatif.

Interactions virus-hôte

Comme le démontre la réplication de son génome, entièrement réalisée *via* les ARN polymérases, le HDV est extrêmement dépendant des facteurs des cellules hôtes pour l'accomplissement de son cycle répliatif. Même si ces interactions sont encore largement méconnues, un certain nombre d'acteurs cellulaires ont été décrits. Récemment, un criblage génomique a montré la forte dépendance du HDV à la biosynthèse des pyrimidines. En effet, l'inhibition de l'enzyme CAD (pour *Carbamyl-phosphate synthase II / Aspartate carbamoyltransférase / Dihydroorotase*), qui catalyse les trois premières étapes de la synthèse de l'uridine, inhibe fortement la réplication du HDV *in vitro*, sans impacter la réplication du HBV dans le laps de temps de l'étude [43]. De plus, l'inhibition du récepteur alpha des œstrogènes (ESR1), qui régule l'expression de CAD, inhibe également la réplication virale. En plus de la synthèse des pyrimidines, les résultats du criblage suggèrent l'importance d'autres facteurs cellulaires dans l'infection HDV, notamment des gènes impliqués dans la résistance à l'insuline ou la voie de signalisation HIF-1 (*hypoxia-*

inducible factor). À ce jour, il est décrit que l'AgHD interagit avec plus d'une centaine de protéines, dont beaucoup sont impliquées dans le métabolisme de l'ARN, mais également des hélicases à ARN, l'histone H1, ou encore des sous-unités de l'ARN polymérase II [44]. Les ARNs du HDV se lient également avec des protéines cellulaires, notamment la protéine kinase R ou ADAR1, qui catalyse l'édition de l'ARN antigénomique [45-47]. Au niveau des senseurs de l'immunité innée, le génome du HDV est détecté par l'hélicase MDA5 (*melanoma differentiation associated gene 5*), induisant la production d'IFN de type I et III [48]. La production d'ISG (*interferon stimulated gene*) n'a cependant que peu d'effet sur la réplication du HDV, qui inhibe activement les voies de signalisation de la réponse immunitaire innée en inhibant la phosphorylation de STAT1 (*signal transducer and activator of transcription 1*) et STAT2, et par conséquent l'expression des ISG [49]. En revanche, L-AgHD induit l'activation de NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) et de STAT3 *via* le stress oxydatif [50]. L'activation de ces facteurs de transcription participe à l'état inflammatoire hépatique et pourrait expliquer l'aggravation et l'accélération de la maladie hépatique chez le patient.

Par ailleurs, l'infection par le HDV induit chez les patients une réponse immunitaire adaptative soutenue. En effet, une étude menée sur des patients atteints d'hépatite virale HBV, HBV/HDV ou virus de l'hépatite C (HCV pour *hepatitis C virus*) a montré que les patients HDV présentent les taux les plus élevés de lymphocytes T CD4⁺ perforine-positifs [51]. Ces lymphocytes éliminent les cellules infectées et jouent probablement un rôle dans la progression plus rapide de la maladie hépatique chez les patients HDV. L'infection induit également une réponse immunitaire *via* les lymphocytes T CD8⁺ [52], mais un échappement viral par mutations est observé chez les patients, limitant le contrôle de l'infection. Ces lymphocytes T CD8⁺ reconnaissant des épitopes du HDV sont retrouvés à la fois chez les patients chroniques et chez les patients ayant résolu l'infection, suggérant que ces mutations pourraient expliquer au moins en partie la mise en place d'une infection chronique, les mutants HDV échappant au contrôle des cellules T CD8⁺ [52].

Importance clinique

Histoire naturelle

Chez le patient, il existe deux types d'infection par le HDV : 1) la co-infection initiale simultanée d'un patient sain par le HBV et le HDV, qui évolue chez la majorité des adultes vers l'élimination spontanée des virus (> 95 % des cas), comme lors d'une mono-infection HBV [53], avec cependant un risque accru d'hépatite fulminante [54, 55] ; 2) la surinfection HDV chez un patient HBC, qui évolue majoritairement vers une infection persistante et une

hépatite D chronique (environ 80 % des cas), caractérisée par une inflammation et une fibrose hépatiques progressant avec un risque trois fois plus élevé vers la cirrhose que chez les patients HBC [53, 56]. De plus, le risque de survenue d'un carcinome hépatocellulaire est trois fois plus élevé que pour des patients HBC [57]. En comparaison des autres hépatites chroniques, l'hépatite D est marquée par une progression rapide vers la cirrhose, et un risque de mortalité plus élevé [4].

Diagnostic

Actuellement, il existe trois méthodes de détection du HDV mais ces méthodes restent inégalement disponibles et de fiabilité variable. Lors de l'infection aiguë, le HDV exprime et sécrète fortement AgHD qui peut être détecté par ELISA. Cependant, ce test n'est réalisable que lors des deux premières semaines d'infection, l'AgHD n'étant ensuite exprimé que de manière transitoire [58, 59].

La seconde méthode consiste à détecter les anticorps anti-HDV [60]. Les IgM sont les premières produites, concomitamment aux IgM anti-HBc (anti-*HBV core protein*) dans le cas d'une co-infection. Les IgG anti-HDV produites ensuite persistent dans le sérum des patients, que l'infection aiguë ait été résolue ou qu'elle soit devenue chronique. Chez les patients positifs pour AgHBs, la détection des IgG et IgM (Ig totaux) anti-HDV est généralement la première phase de diagnostic d'une infection HDV, même si le risque de faux-négatifs existe [10]. De plus, la détection d'IgG anti-HDV ne permet actuellement pas de conclure à une répllication active du virus, les IgG persistant en cas d'infection résolue spontanément. Une nouvelle méthode récemment développée, Q-MAC (*quantitative microarray antibody capture*), en plus d'être largement plus sensible et spécifique que les précédentes, permettrait, en fonction de l'intensité du signal, de discriminer les patients présentant ou non une activité répllicative du HDV, même si ce test nécessite encore des études sur des cohortes plus larges [61, 62].

La troisième méthode consiste à détecter l'ARN viral du HDV dans le sérum des patients par qRT-PCR, seul marqueur d'une répllication active du HDV dans les hépatocytes. La détection de l'ARN viral, après détection des Ig totaux anti-HDV, dans le sérum permet de distinguer une infection aiguë résolue, d'une infection chronique. Cependant, les différents tests disponibles en fonction des pays n'ont pas la même sensibilité ni la même précision dans la détermination de la charge virale. De plus, le HDV ayant une forte variabilité génétique, les tests ne détectent pas efficacement les 8 génotypes viraux [63, 64]. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a récemment mis en place un ARN standard international afin de permettre aux laboratoires d'exprimer leurs résultats en unité internationale

(UI). Depuis, plusieurs kits de détection de la charge virale ont été développés permettant une meilleure détection de tous les génotypes ainsi qu'une meilleure reproductibilité. L'un de ces kits, l'Eurobioplex HDV kit, a montré sur des échantillons de patients une forte sensibilité, précision et reproductibilité, dans la détection de tous les génotypes du HDV [65]. Une mesure précise de la charge virale du HDV chez les patients est nécessaire car elle est le seul moyen de mesurer et d'analyser la répllication virale afin de suivre l'efficacité des traitements antiviraux.

Traitements actuels

Les méthodes de détection du HDV et le suivi des patients évoluent mais les traitements actuels reposent toujours sur l'utilisation de l'interféron-alpha pégylé (PEG-IFN α), peu spécifique et responsable d'effets secondaires marqués tels qu'état grippal, anémie, dépression, conduisant parfois à un arrêt anticipé du traitement. Les réponses au traitement, de l'ordre de 30 %, sont partielles et conduisent rarement à l'élimination persistante de la charge virale [66-68]. Il est à noter que les analogues de nucléo(s)tidés (NUC) utilisés dans le traitement contre le HBV sont inefficaces contre le HDV [12]. Plusieurs éléments peuvent expliquer la difficulté de traitement du HDV. Premièrement, le HDV ne code pour aucune enzyme dans son génome dont la fonction pourrait être ciblée par un traitement antiviral direct. Si le ribozyme du génome présente bien une activité enzymatique, les tentatives d'utilisation d'inhibiteurs de ribozyme se sont heurtées à une très forte toxicité *in vitro*, limitant leur caractérisation antivirale [69]. Par ailleurs, en plus d'une forte diminution de la répllication du HDV, il est nécessaire d'inhiber l'expression d'AgHBs, responsable du rebond de charge virale HDV après arrêt du traitement PEG-IFN α , même si le sujet a développé une réponse virologique soutenue [70]. Cette inhibition n'est cependant observée que chez une minorité de patients à l'aide des traitements PEG-IFN α actuels (10 % environ) [70].

Par conséquent, de nouvelles stratégies de traitement du HDV sont attendues. Dans ce contexte, les molécules ciblant les facteurs hépatiques peuvent être de nouvelles armes antivirales, dont l'efficacité a été démontrée pour d'autres virus hépatiques [71-73]. Ce type de stratégie nécessite toutefois une connaissance approfondie des cycles viraux et des interactions moléculaires entre virus et facteurs cellulaires.

Perspectives thérapeutiques : molécules ciblant l'hôte

Actuellement, plusieurs traitements sont en phase avancée d'essai clinique (*tableau 1*). Ils ciblent différentes étapes

Tableau 1 Molécules antivirales en essai clinique.

	Cible cellulaire / étape du cycle viral	Stade essai clinique	Administration	Avantages	Inconvénients	Références
Myrcludex B	NTCP / inhibiteur d'entrée	Phase II	Injection sous-cutanée 2, 5 ou 10 mg + 245 mg Ténofovir par jour (24 semaines)	1,6-2,7 log réduction ARN HDV	Rechute chez 60-83 % des patients	Wedemeyer <i>et al.</i> , 2018
Lonafarnib (LNF) + Ritonavir (RTV)	Farnésylation / inhibiteur d'assemblage	Phase II	Orale 50-100 mg LNF + 100 mg RTV par jour (24 semaines)	1,6 log réduction ARN HDV ; ARN HDV indétectable chez 1 patient	Fortes augmentations des ALT après arrêt du traitement chez 30 % des patients ; pas de données sur rechutes	Wedemeyer <i>et al.</i> , 2017
REP2139	? / Sécrétion d'AgHBs	Phase II	Injection intraveineuse 500 mg par semaine (15 semaines), 250 mg + 180 µg Peg-IFN (15 semaines), 180 µg Peg-IFN (33 semaines)	ARN HDV indétectable chez 7 patients sur 11	Fortes augmentations des ALT, pas de données sur rechutes	Bazinet <i>et al.</i> , 2017 ; Vaillant, 2018

du cycle viral à savoir : l'entrée virale, l'assemblage des particules virales et la sécrétion d'AgHBs.

*Inhibiteur de l'entrée virale :
l'exemple du Myrcludex B*

Le HBV et le HDV utilisent la même enveloppe virale et, de ce fait, le même récepteur, NTCP [74]. Ce récepteur spécifique du foie, a rapidement été considéré comme une cible thérapeutique d'intérêt après la découverte de son rôle dans l'entrée des deux virus (pour des revues, voir [74, 75]). Si de nombreux inhibiteurs de NTCP décrits ont montré une activité antivirale prometteuse, c'est un lipopeptide dérivé de la partie pré-S1 de l'enveloppe du HBV qui concentre l'essentiel des attentions. Même avant la découverte du récepteur, ce peptide était connu pour son activité préventive *in vivo*, inhibant l'infection par le HBV et le HDV dans un modèle murin [76]. Le peptide pré-S1, site de liaison de l'enveloppe virale au récepteur, se fixe spécifiquement sur NTCP [77-79]. La forme commerciale du peptide, le Myrcludex B, peptide myristoylé dérivant des 47 acides aminés en N-terminal du domaine pré-S1 d'AgHBs, a été testé pour son activité antivirale dans de nombreux modèles *in vitro* et *in vivo* et en essai clinique [80]. Dans cet essai, 24 patients HDV co-infectés HBV ont été divisés en trois groupes afin de recevoir, pendant 24 semaines, des injections sous-cutanées quotidiennes de 2 mg de Myrcludex B, couplé ou non au Peg-IFN α , comparé à un traitement Peg-IFN α seul. Le critère principal de l'étude reposait sur la mesure du taux d'AgHBs. Aucune baisse significative d'AgHBs n'a été observée chez les patients après traitement. Toutefois, dans le groupe de patients traités uniquement avec Myrcludex B, 6 patients (75 %) ont montré une stabilisation des ALT (alanine aminotransférase) et 4 patients (50 %) ont montré une baisse de l'ARN HDV sérique de plus d'un log. De plus, l'élimination du virus a été atteinte chez 2 patients (25 %). Le groupe traité avec Myrcludex B en combinaison au Peg-IFN α a montré de meilleurs résultats avec l'ARN HDV devenu indétectable chez 5 patients (62,5 %), en revanche l'ARN HDV est réapparu chez tous les patients après arrêt du traitement, quel que soit le traitement administré [81]. Plus récemment, les résultats d'un essai multicentrique ouvert de phase II ont été rendus publics [82]. Cet essai, réalisé sur une cohorte de 120 patients co-infectés HBV/HDV, avait pour but de déterminer la tolérance et l'efficacité d'un traitement composé de différentes doses de Myrcludex B en combinaison avec du ténofovir, un inhibiteur de la transcriptase inverse du HBV [83]. Les patients, divisés en quatre groupes, ont reçu quotidiennement 2, 5 ou 10 mg de Myrcludex B par injection sous-cutanée en combinaison avec du ténofovir (245 mg/jour), comparé à un traitement au ténofovir seul pendant 24 semaines. Après cette phase, tous les patients ont ensuite suivi un traitement au ténofovir pen-

dant 24 semaines. Le critère principal était une diminution de l'ARN HDV de 2 log ou une absence d'ARN viral détectable. À la fin du traitement, l'ARN HDV avait diminué en moyenne entre 1,6 et 2,7 log, la plus forte dose de Myrcludex B étant reliée à la baisse d'ARN HDV la plus forte. Un suivi à 12 semaines sur une partie des patients a révélé la rechute de l'infection chez 60 % à 83 % des patients en fonction des groupes. Plus récemment, les résultats provisoires de l'étude de phase II MYR203 indiquent des niveaux indétectables de HDV chez 9 des 15 patients traités 48 semaines avec une dose quotidienne de Myrcludex B (2 mg) en combinaison avec le PEG-IFN α [84]. Probablement insuffisant en monothérapie, l'utilisation du Myrcludex B semble donc bénéfique chez les patients HDV en combinaison avec du ténofovir ou du PEG-IFN α . Cependant, quelques effets secondaires ont été enregistrés (démangeaisons, augmentation des acides sériques, etc.) et les questions en suspens restent la sécurité et la tolérance à long terme, notamment chez les patients cirrhotiques.

Inhibiteur de l'assemblage : lonafarnib

Durant le cycle viral du HDV, la protéine L-AgHD est farnésylée et cette étape précède l'interaction avec AgHBs. L'inhibition de la farnésylation de L-AgHD inhibe l'assemblage des nouvelles particules virales dans des modèles cellulaires et murins [85, 86]. Le lonafarnib est un inhibiteur de farnésylation qui a d'abord été testé comme anti-cancéreux et ayant des effets bénéfiques chez les patients atteints du syndrome de Hutchinson-Gilford (progeria) [87]. Bien que son efficacité n'ait pas été démontrée dans ce contexte, les premières études ont fourni des données de tolérance chez le patient. Un premier essai chez des patients HDV a été réalisé durant lequel deux doses de lonafarnib (100 mg et 200 mg) ont été administrées deux fois par jour par voie orale pendant 28 jours. Comparés à un placebo, les deux groupes de patients ont montré une baisse significative de l'ARN HDV (0,73 log pour le groupe 100 mg ; 1,54 log pour le groupe 200 mg). En revanche, le traitement n'a induit aucune baisse ni des ALT, ni des AgHBs, et le taux d'ARN HDV est revenu à la normale chez la totalité des patients à la fin de la période de suivi. De plus, tous les patients ayant reçu la plus forte dose de lonafarnib ont subi de forts effets secondaires tels que des diarrhées, des nausées et une perte de poids [88]. Afin d'améliorer l'absorption dans le sang de lonafarnib et diminuer les effets secondaires, quatre études de phases II appelées LOWR-HDV ont été réalisées avec un traitement lonafarnib en combinaison avec le ritonavir, un inhibiteur du cytochrome P450-3A4 qui est le principal acteur du métabolisme du lonafarnib et améliore sa stabilité sans effet antiviral direct [89]. De manière générale, ces études ont montré que la combinaison des deux traitements

permet de diminuer la dose de lonafarnib administrée quotidiennement et d'améliorer la tolérance chez le patient [90, 91]. Cette combinaison de traitement a une meilleure efficacité sur la diminution de l'ARN HDV mais cette forte baisse est en général observée pour la moitié des patients seulement, et aucune information sur le suivi de ces patients après arrêt du traitement n'est encore disponible.

Les polymères d'acides nucléiques

Les polymères d'acides nucléiques (NAP) sont des oligonucléotides phosphorothioés leur conférant une résistance à la dégradation et à la dénaturation *in vivo*. Ils possèdent une activité inhibitrice à large spectre contre plusieurs virus comme le HCV [92] ou le virus herpes simplex [93]. Bien que leur mécanisme d'action précis ne soit pas connu avec précision, différents NAPs inhibent l'entrée des particules HDV *in vitro* [94]. De plus, les NAPs semblent inhiber la sécrétion d'AgHBs, affectant potentiellement le cycle du HDV *via* divers mécanismes [95]. Leur activité est indépendante de leur séquence mais dépendante de leur taille et de leur hydrophobicité [95]. La première étude *in vivo* a été conduite chez des canards infectés par le HBV du canard (DHBV) et traités pendant 28 jours avec le NAP REP2055. L'étude a montré une baisse d'AgHBs dans le sérum et de l'ADN DHBV, jusqu'à 16 semaines post-traitement, ainsi qu'une augmentation des anticorps anti-DHBV [96]. La tolérance et l'efficacité de REP2055 ainsi que de REP2139, un dérivé de REP2055, ont été étudiées dans une étude portant sur des patients HBV positifs à AgHBe. Pour chacun des composés, le traitement en monothérapie a montré une baisse de AgHBs dans le sérum de 2 à 7 log et de l'ADN HBV de 3 à 9 log. De plus, les traitements ont été accompagnés d'une production d'anticorps anti-HBs [97]. Le NAP REP2139 ayant montré une meilleure tolérance chez les patients ainsi qu'une forte efficacité, il a ensuite été utilisé dans une nouvelle étude afin d'évaluer sa tolérance et son efficacité en co-traitement avec Peg-IFN α sur des patients co-infectés avec HBV et HDV. Les patients ont été injectés une fois par semaine par voie intraveineuse avec 500 mg de REP2139-Ca seul pendant 15 semaines. Le traitement a été suivi par 15 semaines de traitement avec 250 mg de REP2139-Ca combiné à 180 μ g de Peg-IFN α puis 33 semaines de traitement avec 180 μ g de Peg-IFN α seul [98]. Après traitement, les patients ont été suivis pendant deux ans et l'ARN HDV est resté indétectable chez 7 patients (64 %), avec les AgHBs et l'ADN HBV en-dessous du seuil de détection chez 4 (36 %) et 6 (54 %) patients, respectivement [99]. Les résultats obtenus lors de ces études sont pour l'instant les plus convaincants, cependant les cohortes étudiées restent de petite taille et les effets restent à confirmer sur de plus grandes populations. De plus, le mode d'administration n'est pas adapté à un traitement

de longue durée. De nouvelles études seront menées afin de tester la tolérance du traitement en administration sous-cutanée. Enfin, le traitement au Peg-IFN α a induit chez 5 patients une forte augmentation des ALT [99]. Les patients de l'étude étant non-cirrhotiques, cette augmentation est restée asymptomatique et s'est résolue après arrêt du traitement. Le traitement pourrait cependant être plus délétère chez des patients cirrhotiques.

Conclusion

L'hépatite D reste aujourd'hui incurable et représente une menace de santé publique majeure pour des millions de patients à travers le monde. Les données épidémiologiques actuelles sont des estimations approximatives car la présence du HDV chez les patients HBV est encore trop peu souvent recherchée dans certains pays. En plus d'une meilleure détection, les traitements nécessitent également d'être améliorés. Les avancées récentes sur le cycle viral ont permis l'émergence de nouvelles solutions thérapeutiques qui démontrent l'intérêt des molécules ciblant l'hôte dans le traitement contre ce virus. La caractérisation exhaustive des facteurs hépatocytaires impliqués dans le cycle viral permettra à terme le développement de nouvelles solutions thérapeutiques pour l'éradication de ce virus hépatique majeur.

Remerciements. Les travaux de l'unité résumés dans cette revue ont notamment été financés par l'Agence nationale de la recherche sur le sida et les hépatites virales (ANRS). Cette revue est écrite dans le cadre du LabEx HepSYS (ANR-10-LAB-28). Vincent Turon-Lagot bénéficie d'un contrat doctoral (MRES) du ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche.

Figures : certains éléments de figure ont été reproduits ou modifiés avec l'autorisation de Servier Medical Art (licence : <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/fr/>).

Liens d'intérêt : les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en rapport avec l'article.

Références

- Rizzetto M, Canese MG, Aricò S, Crivelli O, Trepo C, Bonino F, Verme G. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut* 1977; 18: 997-1003.
- Rizzetto M, Hoyer B, Canese MG, Shih JW, Purcell RH, Gerin JL. Delta Agent : association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77: 6124-8.

- Sureau C, Guerra B, Lanford RE. Role of the large hepatitis B virus envelope protein in infectivity of the hepatitis delta virion. *J Virol* 1993; 67: 366-72.
- Sureau C, Negro F. The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis. *J Hepatol* 2016; 64: S102-16.
- Trépo C, Chan HLY, Lok A. Hepatitis B virus infection. *Lancet* 2014; 384: 2053-63.
- Chen HY, Shen DT, Ji DZ, Han PC, Zhang WM, et al. Prevalence and burden of hepatitis D virus infection in the global population: a systematic review and meta-analysis. *Gut* 2018 ; sous presse. doi:10.1136/gutjnl-2018-316601.
- Amini N, Alavian SM, Kabir A, Aalaei-Andabali SH, Saiedi Hosseini SY, Rizzetto M. Prevalence of hepatitis d in the eastern mediterranean region: systematic review and meta analysis. *Hepat Mon* 2013; 13: e8210.
- Daw MA, Daw AM, Sifennasr NEM, Draha AM, Daw AM, Daw AM, et al. The Epidemiology of Hepatitis D Virus in North Africa: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Scientific World Journal* 2018: 9312650.
- Stockdale AJ, Chaponda M, Beloukas A, Phillips RO, Matthews PC, Papadimitropoulos A, et al. Prevalence of hepatitis D virus infection in sub-Saharan Africa : a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health* 2017; 5: e992-1003.
- Noureddin M, Gish R. Hepatitis delta : epidemiology, diagnosis and management 36 years after discovery. *Curr Gastroenterol Rep* 2014; 16: 365.
- Bonino F, Heermann KH, Rizzetto M, Gerlich WH. Hepatitis delta virus : protein composition of delta antigen and its hepatitis B virus-derived envelope. *J Virol* 1986; 58: 945-50.
- Koh C, Heller T, Glenn JS. Pathogenesis of and New Therapies for Hepatitis D. *Gastroenterology* 2019; 156: 461-76.
- Farci P, Niro GA. Clinical features of hepatitis D. *Semin Liver Dis* 2012; 32: 228-36.
- Tsagris EM, Martínez de Alba AE, Gozmanova M, Kalantidis K. Viroids. *Cell Microbiol* 2008; 10: 2168-79.
- Tabler M, Tsagris M. Viroids : petite RNA pathogens with distinguished talents. *Trends Plant Sci* 2004; 9: 339-48.
- Flores R, Gas ME, Molina-Serrano D, Nohales MÁ D, Carbonell A, Gago S, et al. Viroid replication : rolling-circles, enzymes and ribozymes. *Viruses* 2009; 1: 317-34.
- AbouHaidar MG, Venkataraman S, Golshani A, Liu B, Ahmad T. Novel coding, translation, and gene expression of a replicating covalently closed circular RNA of 220 nt. *PNAS* 2014; 111: 14542-7.
- Takeda R, Ding B. Viroid intercellular trafficking: RNA motifs, cellular factors and broad impacts. *Viruses* 2009; 1: 210-21.
- Brazas R, Ganem D. A cellular homolog of hepatitis delta antigen: implications for viral replication and evolution. *Science* 1996; 274: 90-4.
- Salehi-Ashtiani K, Lupták A, Litovchick A, Szostak JW. A genome-wide search for ribozymes reveals an HDV-like sequence in the human CPEB3 gene. *Science* 2006; 313: 1788-92.
- Nigro JM, Cho KR, Fearon ER, Kern SE, Ruppert JM, Oliner JD, et al. Scrambled exons. *Cell* 1991; 64: 607-13.
- Zhang J, Liu H, Hou L, Wang G, Zhang R, Huang Y, et al. Circular RNA_LARP4 inhibits cell proliferation and invasion of gastric cancer by sponging miR-424-5p and regulating LATS1 expression. *Mol Cancer* 2017; 16: 151.
- Fu L, Chen Q, Yao T, Li T, Ying S, Hu Y, Guo J. Hsa_circ_0005986 inhibits carcinogenesis by acting as a miR-129-5p sponge and is used as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2017; 8: 43878-88.
- Han D, Li J, Wang H, Su X, Hou J, Gu Y, et al. Circular RNA circMTO1 acts as the sponge of microRNA-9 to suppress hepatocellular carcinoma progression. *Hepatology* 2017; 66: 1151-64.
- Wille M, Netter HJ, Littlejohn M, Yuen L, Shi M, Eden JS, et al. A Divergent Hepatitis D-Like Agent in Birds. *Viruses* 2018; 10: E720.

26. Schulze A, Gripon P, Urban S. Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology* 2007 ; 46 : 1759-68.
27. 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 ; 63 : 35-48.
28. Li W, Urban S. Entry of hepatitis B and hepatitis D virus into hepatocytes : Basic insights and clinical implications. *J Hepatol* 2016 ; 64 : S32-40.
29. 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.
30. Ni Y, Lempp FA, Mehrle S, Nkongolo S, Kaufman C, Fälth M, *et al.* Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology* 2014 ; 146 : 1070-83.
31. Alves C, Freitas N, Cunha C. Characterization of the nuclear localization signal of the hepatitis delta virus antigen. *Virology* 2008 ; 370 : 12-21.
32. Chou HC, Hsieh TY, Sheu GT, Lai MM. Hepatitis delta antigen mediates the nuclear import of hepatitis delta virus RNA. *J Virol* 1998 ; 72 : 3684-90.
33. Modahl LE, Lai MM. Transcription of hepatitis delta antigen mRNA continues throughout hepatitis delta virus (HDV) replication: a new model of HDV RNA transcription and replication. *J Virol* 1998 ; 72 : 5449-56.
34. Macnaughton TB, Shi ST, Modahl LE, Lai MMC. Rolling circle replication of hepatitis delta virus RNA is carried out by two different cellular RNA polymerases. *J Virol* 2002 ; 76 : 3920-7.
35. Huang WH, Chen YS, Chen PJ. Nucleolar targeting of hepatitis delta antigen abolishes its ability to initiate viral antigenomic RNA replication. *J Virol* 2008 ; 82 : 692-9.
36. Lee CH, Chang SC, Wu CH, Chang MF. A novel chromosome region maintenance 1-independent nuclear export signal of the large form of hepatitis delta antigen that is required for the viral assembly. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 8142-8.
37. Glenn JS, Watson JA, Havel CM, White JM. Identification of a prenylation site in delta virus large antigen. *Science* 1992 ; 256 : 1331-3.
38. Otto JC, Casey PJ. The hepatitis delta virus large antigen is farnesylated both in vitro and in animal cells. *J Biol Chem* 1996 ; 271 : 4569-72.
39. Hwang SB, Lai MM. Isoprenylation masks a conformational epitope and enhances trans-dominant inhibitory function of the large hepatitis delta antigen. *J Virol* 1994 ; 68 : 2958-64.
40. Huang HC, Lee CP, Liu HK, Chang MF, Lai YH, Lee YC, Huang C. Cellular Nuclear Export Factors TAP and Aly Are Required for HDV Ag-L-mediated Assembly of Hepatitis Delta Virus. *J Biol Chem* 2016 ; 291 : 26226-38.
41. Hwang SB, Lai MM. Isoprenylation mediates direct protein-protein interactions between hepatitis large delta antigen and hepatitis B virus surface antigen. *J Virol* 1993 ; 67 : 7659-62.
42. Freitas N, Cunha C, Menne S, Gudima SO. Envelope proteins derived from naturally integrated hepatitis B virus DNA support assembly and release of infectious hepatitis delta virus particles. *J Virol* 2014 ; 88 : 5742-54.
43. Verrier ER, Weiss A, Bach C, Heydmann L, Turon-Lagot V, Kopp A, *et al.* Combined small molecule and loss-of-function screen uncovers estrogen receptor alpha and CAD as host factors for HDV infection and antiviral targets. *Gut* 2019 ; sous presse. doi:10.1136/gutjnl-2018-317065.
44. Cao D, Haussecker D, Huang Y, Kay MA. Combined proteomic-RNAi screen for host factors involved in human hepatitis delta virus replication. *RNA* 2009 ; 15 : 1971-9.
45. Mota S, Mendes M, Penque D, Coelho AV, Cunha C. Changes in the proteome of Huh7 cells induced by transient expression of hepatitis D virus RNA and antigens. *J Proteomics* 2008 ; 71 : 71-9.
46. Mota S, Mendes M, Freitas N, Penque D, Coelho AV, Cunha C. Proteome analysis of a human liver carcinoma cell line stably expressing hepatitis delta virus ribonucleoproteins. *J Proteomics* 2009 ; 72 : 616-27.
47. Sikora D, Greco-Stewart VS, Miron P, Pelchat M. The hepatitis delta virus RNA genome interacts with eEF1A1, p54(nrb), hnRNP-L, GAPDH and ASF/SF2. *Virology* 2009 ; 390 : 71-8.
48. Zhang Z, Filzmayer C, Ni Y, Sültmann H, Mutz P, Hiet MS, *et al.* Hepatitis D virus replication is sensed by MDA5 and induces IFN- β / λ responses in hepatocytes. *J Hepatol* 2018 ; 69 : 25-35.
49. Pugnale P, Paziienza V, Guilloux K, Negro F. Hepatitis delta virus inhibits alpha interferon signaling. *Hepatology* 2009 ; 49 : 398-406.
50. Williams V, Brichtler S, Khan E, Chami M, Dény P, Kremesdorf D, Gordien E. Large hepatitis delta antigen activates STAT-3 and NF- κ B via oxidative stress. *J Viral Hepat* 2012 ; 19 : 744-53.
51. Aslan N, Yurdaydin C, Wiegand J, Greten T, Ciner A, Meyer MF, *et al.* Cytotoxic CD4+ T cells in viral hepatitis. *J Viral Hepat* 2006 ; 13 : 505-14.
52. Karimzadeh H, Kiraithe MM, Oberhardt V, Alizei ES, Bockmann J, Zur Wiesch JS, *et al.* Mutations in Hepatitis D Virus Allow it to Escape Detection by CD8+ T Cells and Evolve at the Population Level. *Gastroenterology* 2019. Sous presse. doi:10.1053/j.gastro.2019.02.003.
53. Negro F. Hepatitis D virus coinfection and superinfection. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014 ; 4 : a021550.
54. Smedile A, Verme G, Cargnel A, Dentico P, Opolon P, Vergani D, *et al.* Influence of Delta Infection on Severity of Hepatitis B. *The Lancet* 1982 ; 320 : 945-7.
55. Govindarajan S, Chin KP, Redeker AG, Peters RL. Fulminant B viral hepatitis: role of delta agent. *Gastroenterology* 1984 ; 86 : 1417-20.
56. Fattovich G, Boscaro S, Noventa F, Pomaro E, Stenico D, Alberti A, *et al.* Influence of hepatitis delta virus infection on progression to cirrhosis in chronic hepatitis type B. *J Infect Dis* 1987 ; 155 : 931-5.
57. Fattovich G, Giustina G, Christensen E, Pantalena M, Zagni I, Realdi G, Schalm SW. Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. The European Concerted Action on Viral Hepatitis (Eurohep). *Gut* 2000 ; 46 : 420-6.
58. Shattock AG, Morgan BM. Sensitive enzyme immunoassay for the detection of delta antigen and anti-delta, using serum as the delta antigen source. *J Med Virol* 1984 ; 13 : 73-82.
59. Shattock AG, Morris MC. Evaluation of commercial enzyme immunoassays for detection of hepatitis delta antigen and anti-hepatitis delta virus (HDV) and immunoglobulin M anti-HDV antibodies. *J Clin Microbiol* 1991 ; 29 : 1873-6.
60. Aragona M, Macagno S, Caredda F, Crivelli O, Lavarini C, Maran E, *et al.* Serological response to the hepatitis delta virus in hepatitis D. *Lancet* 1987 ; 1 : 478-80.
61. Chen X, Oidovsambuu O, Liu P, Grosely R, Elazar M, Winn VD, *et al.* A novel quantitative microarray antibody capture assay identifies an extremely high hepatitis delta virus prevalence among hepatitis B virus-infected mongolians. *Hepatology* 2017 ; 66 : 1739-49.
62. Mahale P, Aka PV, Chen X, Liu P, Fram BJ, Wang AS, *et al.* Hepatitis D Viremia Among Injection Drug Users in San Francisco. *J Infect Dis* 2018 ; 217 : 1902-6.
63. Brichtler S, Le Gal F, Butt A, Chevret S, Gordien E. Commercial real-time reverse transcriptase PCR assays can underestimate or fail to quantify hepatitis delta virus viremia. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013 ; 11 : 734-40.
64. Brichtler S, Le Gal F, Neri-Pinto F, Mansour W, Roulot D, Laperche S, Gordien E. Serological and molecular diagnosis of hepatitis delta virus infection: results of a French national quality control study. *J Clin Microbiol* 2014 ; 52 : 1694-7.
65. Le Gal F, Dziri S, Gerber A, Alloui C, Ben Abdesselam Z, Roulot D, *et al.* Performance Characteristics of a New Consensus Commercial Kit for Hepatitis D Virus RNA Viral Load Quantification. *J Clin Microbiol* 2017 ; 55 : 431-41.

66. Lempp FA, Ni Y, Urban S. Hepatitis delta virus : insights into a peculiar pathogen and novel treatment options. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016 ; 13 : 580-9.
67. Wedemeyer H, Yurdaydin C, Dalekos GN, Erhardt A, Çakaloğlu Y, Değertekin H, *et al.* Peginterferon plus Adefovir versus Either Drug Alone for Hepatitis Delta. *N Engl J Med* 2011 ; 364 : 322-31.
68. Yurdaydin C. New treatment option for delta virus: is a cure in sight ? *J Viral Hepat* 2019 ; sous presse. doi:10.1111/jvh.13081.
69. Buchmann B, Döhner K, Schirdewahn T, Sodeik B, Manns MP, Wedemeyer H, *et al.* A screening assay for the identification of host cell requirements and antiviral targets for hepatitis D virus infection. *Antiviral Res* 2017 ; 141 : 116-23.
70. Heidrich B, Yurdaydin C, Kabaçam G, Ratsch BA, Zachou K, Bremer B, *et al.* Late HDV RNA relapse after peginterferon alpha-based therapy of chronic hepatitis delta. *Hepatology* 2014 ; 60 : 87-97.
71. Baumert TF, Verrier ER, Nassal M, Chung RT, Zeisel MB. Host-targeting agents for treatment of hepatitis B virus infection. *Curr Opin Virol* 2015 ; 14 : 41-6.
72. Colpitts CC, Verrier ER, Baumert TF. Targeting Viral Entry for Treatment of Hepatitis B and C Virus Infections. *ACS Infect Dis* 2015 ; 1 : 420-7.
73. Crouch E, Wrens F, Schuster C, Zeisel MB, Baumert TF. Host-targeting therapies for hepatitis C virus infection: current developments and future applications. *Therap Adv Gastroenterol* 2018 ; 11 : 1-15.
74. Verrier ER, Heydmann L, Baumert TF, Schuster C. Le transporteur d'acides biliaires NTCP, un acteur majeur dans l'infection par les virus humains des hépatites offrant de nouvelles perspectives thérapeutiques. *Virologie* 2018 ; 22 : 55-66.
75. Verrier ER, Colpitts CC, Sureau C, Baumert TF. Hepatitis B virus receptors and molecular drug targets. *Hepatol Int* 2016 ; 10 : 567-73.
76. Petersen J, Dandri M, Mier W, Lütgehetmann M, Volz T, Weizsäcker F, von F, *et al.* Prevention of hepatitis B virus infection *in vivo* by entry inhibitors derived from the large envelope protein. *Nature Biotechnol* 2008 ; 26 : 335-41.
77. Barrera A, Guerra B, Notvall L, Lanford RE. Mapping of the hepatitis B virus pre-S1 domain involved in receptor recognition. *J Virol* 2005 ; 79 : 9786-98.
78. Gripon P, Cannie I, Urban S. Efficient Inhibition of Hepatitis B Virus Infection by Acylated Peptides Derived from the Large Viral Surface Protein. *J Virol* 2005 ; 79 : 1613-22.
79. Lütgehetmann M, Mancke LV, Volz T, Helbig M, Allweiss L, Bornscheuer T, *et al.* Humanized chimeric uPA mouse model for the study of hepatitis B and D virus interactions and preclinical drug evaluation. *Hepatology* 2012 ; 55 : 685-94.
80. 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 ; 65 : 490-8.
81. Farci P, Niro GA. Current and Future Management of Chronic Hepatitis D. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 2018 ; 14 : 342-51.
82. Wedemeyer H, Bogomolov P, Blank A, Allweiss L, Dandri-Petersen M, Bremer B, *et al.* Final results of a multicenter, open-label phase 2b clinical trial to assess safety and efficacy of Myrcludex B in combination with Tenofovir in patients with chronic HBV/HDV co-infection. *J Hepatol* 2018 ; 68 : S3.
83. Lou L. Advances in Nucleotide Antiviral Development from Scientific Discovery to Clinical Applications: Tenofovir Disoproxil Fumarate for Hepatitis B. *J Clin Transl Hepatol* 2013 ; 1 : 33-8.
84. Wedemeyer H, Schöneweis K, Bogomolov P, Voronkova N, Chulanov V, Stepanova T, *et al.* Interim Results of a Multicentre. Open-Label Phase 2 Clinical Trial (MYR203) to Assess Safety and Efficacy of Myrcludex B in Combination with Peg-Interferon Alpha 2a in Patients with Chronic HBV/HDV Co-Infection. *Hepatology* 2018 ; 68 : S11A.
85. Bordier BB, Marion PL, Ohashi K, Kay MA, Greenberg HB, Casey JL, Glenn JS. A prenylation inhibitor prevents production of infectious hepatitis delta virus particles. *J Virol* 2002 ; 76 : 10465-72.
86. Bordier BB, Ohkanda J, Liu P, Lee SY, Salazar FH, Marion PL, *et al.* In vivo antiviral efficacy of prenylation inhibitors against hepatitis delta virus. *J Clin Invest* 2003 ; 112 : 407-14.
87. Berndt N, Hamilton AD, Sebt SM. Targeting protein prenylation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2011 ; 11 : 775-91.
88. Koh C, Canini L, Dahari H, Zhao X, Uprichard SL, Haynes-Williams V, *et al.* Oral prenylation inhibition with lonafarnib in chronic hepatitis D infection: a proof-of-concept randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2A trial. *Lancet Infect Dis* 2015 ; 15 : 1167-74.
89. Yurdaydin C, Keskin O, Kalkan Ç, Karakaya F, Çalişkan A, Karataylı E, *et al.* Optimizing lonafarnib treatment for the management of chronic delta hepatitis: The LOWR HDV-1 study. *Hepatology* 2018 ; 67 : 1224-36.
90. Wedemeyer H, Port K, Deterding K, Wranke A, Kirschner J, Bruno B, *et al.* A phase 2 dose-escalation study of lonafarnib plus ritonavir in patients with chronic hepatitis D : final results from the lonafarnib with ritonavir in HDV-4 (LOWR HDV-4) study. *J Hepatol* 2017 ; 66 : S24.
91. Koh C, Surana P, Han T, Fryzek N, Kapuria D, Etzion O, *et al.* A phase 2 study exploring once daily dosing of ritonavir boosted lonafarnib for the treatment of chronic delta hepatitis – end of study results from the LOWR HDV-3 study. *J Hepatol* 2017 ; 66 : S101-2.
92. Matsumura T, Hu Z, Kato T, Dreux M, Zhang YY, Imamura M, *et al.* Amphipathic DNA polymers inhibit hepatitis C virus infection by blocking viral entry. *Gastroenterology* 2009 ; 137 : 673-81.
93. Bernstein DI, Goyette N, Cardin R, Kern ER, Boivin G, Ireland J, *et al.* Amphipathic DNA polymers exhibit antiherpetic activity in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 2008 ; 52 : 2727-33.
94. Beilstein F, Blanchet M, Vaillant A, Sureau C. Nucleic Acid Polymers Are Active against Hepatitis Delta Virus Infection In Vitro. *J Virol* 2018 ; 92 : e01416-1417.
95. Vaillant A. Nucleic acid polymers : Broad spectrum antiviral activity, antiviral mechanisms and optimization for the treatment of hepatitis B and hepatitis D infection. *Antiviral Res* 2016 ; 133 : 32-40.
96. Noordeen F, Scougall CA, Grosse A, Qiao Q, Ajilalian BB, Reaiche-Miller G, *et al.* Therapeutic Antiviral Effect of the Nucleic Acid Polymer REP 2055 against Persistent Duck Hepatitis B Virus Infection. *PLoS ONE* 2015 ; 10 : e0140909.
97. Al-Mahtab M, Bazinet M, Vaillant A. Safety and Efficacy of Nucleic Acid Polymers in Monotherapy and Combined with Immunotherapy in Treatment-Naive Bangladeshi Patients with HBsAg+ Chronic Hepatitis B Infection. *PLoS ONE* 2016 ; 11 : e0156667.
98. Bazinet M, Pântea V, Cebotarescu V, Cojuhari L, Jimbei P, Albrecht J, *et al.* Safety and efficacy of REP 2139 and pegylated interferon alfa-2a for treatment-naïve patients with chronic hepatitis B virus and hepatitis D virus co-infection (REP 301 and REP 301-LTF): a non-randomised, open-label, phase 2 trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2017 ; 2 : 877-89.
99. Vaillant A. REP 2139: Antiviral Mechanisms and Applications in Achieving Functional Control of HBV and HDV Infection. *ACS Infect Dis* 2018. Sous presse. doi:10.1021/acsinfecdis.8b00156.

Approches perte-de-fonction pour l'étude des interactions hôte-virus dans le cas des hépatites virales chroniques

Les virus des hépatites B, C et D (HBV, HCV et HDV, respectivement) sont responsables d'hépatites chroniques évoluant vers des maladies hépatiques telles la fibrose et la cirrhose et pouvant mener au développement d'un carcinome hépatocellulaire. L'étude des interactions virus-hôte permet de comprendre le cycle viral du virus et de découvrir de nouveaux facteurs d'hôte pouvant être des cibles thérapeutiques. Différentes approches perte-de-fonction ont été menées afin d'étudier les interactions entre le HBV, le HDV ou le HCV et leur hôte, l'hépatocyte. Précédemment, le laboratoire a montré l'importance de RACK1 dans la traduction IRES-dépendante du HCV. Dans ce cadre, le rôle de RACK1 dans la régulation de l'inflammation hépatique a été mis en évidence, bien que les mécanismes précis restent à découvrir. Une étude de transcriptomique comparative suggère que le HCV pourrait détourner RACK1 de ses fonctions régulatrices au profit du virus et favoriserait ainsi l'inflammation chronique observée chez les patients. Dans le cadre d'un second projet, une étude perte-de-fonction a permis la découverte de CAD comme facteur d'hôte du HDV et la caractérisation du pouvoir antiviral du PALA, un inhibiteur de CAD. Par la suite, un mini-criblage de perte-de-fonction a mis en évidence le rôle de SLC22A5 comme facteur d'hôte potentiel du HBV et du HDV ainsi que le rôle de SLC2A2 comme facteur de restriction du HBV. Ces travaux de thèse ont permis de mieux comprendre les interactions entre les virus hépatiques chroniques et leur hôte et pourraient mener à la découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le cadre du traitement de ces infections et des maladies hépatiques associées.

Hepatitis B, C and D viruses (HBV, HCV and HDV, respectively) are responsible of chronic hepatitis leading to advanced liver diseases such as fibrosis or cirrhosis and to the development of hepatocellular carcinoma. Studies on virus-host interactions are crucial to better understand viral cycles and to discover new therapeutic targets. Several loss-of-function approaches to study the interactions between HBV, HDV or HCV and their host, the hepatocyte have been undertaken during this PhD work. Our laboratory has previously uncovered the role of RACK1 in IRES-dependent translation of HCV. Here, the crucial role of RACK1 in the regulation of the hepatic inflammation is described, even though the exact mechanisms need to be precised. A comparative transcriptomic study suggests that HCV could hijack RACK1 from his cytosolic role, thus promoting the chronic inflammation observed in patients. In a second project, a loss-of-function screen that led to the characterization of CAD as a host factor in HDV infection, allowed the characterization of the antiviral properties of the CAD inhibitor, PALA. Finally, a small loss-of-function screen targeting transmembrane proteins identified SLC22A5 as a potential host factor for HBV and HDV infection and SLC2A2 as a restriction factor in HBV infection. Overall, this thesis work led to a better understanding of the interactions between chronic hepatitis viruses and the hepatocyte and could lead to the discovery of new therapeutic strategies to treat these viral infections and the associated liver diseases.