$^^

UNIVERSITÉ DE TOURS

ECOLE DOCTORALE SSBCV
INSERM U1259 MAVIVH

THÈSE présentée par :

Virgile Rat

soutenue le : 02 novembre 2021

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Tours**

Discipline : Science de la Vie et de la Santé

Spécialité : Virologie

Analyse de la capside du VHB dans la morphogenèse virale : Etude de sa formation, de son trafic intracellulaire et de son rôle dans la reconnaissance de Pol et de l'ARN

THÈSE dirigée par :

Monsieur DE ROCQUIGNY Hugues	CR, Université de Tours

RAPPORTEURS :

Madame NEUVEUT Christine	DR-INSERM, Montpellier
Monsieur ASSELAH Tarik	PU-PH, Paris

JURY :

Madame DIMIER-POISSON Isabelle	PU, Université de Tours
Madame NEUVEUT Christine	DR-INSERM, Montpellier
Madame TESTONI Barbara	CR, HDR, Lyon
Monsieur ASSELAH Tarik	PU-PH, Paris
Monsieur TRAMIER Marc	IR, HDR, Rennes
Monsieur DE ROCQUIGNY Hugues	CR, Université de Tours

PREAMBULE

« Les meilleures choses qui arrivent […] ne sont pas le résultat du travail d'un seul homme. C'est le travail de toute une équipe. »

Steve Jobs

Remerciements

Dans un premier temps, je souhaiterais remercier **Isabelle Dimier-Poisson**, **Christine Neuveut**, **Tarik Asselah**, **Barbara Testoni** et **Marc Tramier** pour leur présence et leur participation à ma soutenance de thèse. Je remercie particulièrement mes rapporteurs pour le temps consacré à la relecture de mon manuscrit.

J'adresse également mes remerciements à l'**ANRS** et l'**INSERM** pour l'obtention de ma bourse de thèse et le soutien financier qui m'ont permis de mener à bien mes travaux de thèse.

J'aimerais ensuite remercier **Hugues de Rocquigny**. Tout d'abord, pour m'avoir donné ma chance en tant que stagiaire, et par la suite comme thésard. Une opportunité qui m'a permis de publier deux superbes articles. Je garderai méticuleusement en mémoire vos nombreux conseils avisés concernant les manips, l'appréciation des publications (« Oui mais regardes bien le matériel et méthodes.»), la présentation de résultats scientifiques et la rédaction. Arrivant peu à peu au terme de cette aventure, je me rends davantage compte que vous avez fait de votre mieux pour me donner la meilleure formation scientifique possible, et, même si je me tiens encore humblement derrière vous, j'espère bien voir un jour l'élève dépasser le maître. La rigueur scientifique qui vous caractérise m'accompagnera tout au long de ma carrière, ainsi que le souvenir de nos longues conversations sur la théorie d'HBV. Je me souviendrai aussi toujours de votre bonne humeur et votre bienveillance, mais aussi de la première fois, où, en master 2, j'ai fini par comprendre correctement un papier de biophysique. Ne vous en faites pas, je terminerai le livre de Virgil Gheorghiu, il se trouve déjà dans le tiroir de mon bureau. Finalement, j'ai encore beaucoup à dire, mais comme le résume si bien Daniel Pennac, « Ce professeur-là n'inculquait pas un savoir, il offrait ce qu'il savait », et j'ai essayé d'être synthétique.

J'aimerais ensuite témoigner de ma grande reconnaissance à **Philippe Roingeard.** Je soulignerais en premier lieu ta disponibilité et ta bienveillance à toute épreuve, ainsi que tes précieux conseils. Je te remercie de l'aide apportée sur mes articles, mais aussi de t'être penché plus d'une fois sur nos problématiques au cours de nos travaux sur l'ARN et du temps que tu as pu nous accorder pour étudier nos images de microscopie. Je dois dire que je suis admiratif

de ta culture scientifique et de l'humilité avec laquelle tu abordes tes succès. La microscopie est une passion commune que nous partageons avec Hugues et toi, et je souhaite que le laboratoire, la plateforme et la microscopie en général puissent avoir la reconnaissance qui leur est due. Je te souhaite les plus belles images et une très bonne continuation.

Un grand merci à **Marc Tramier** pour ton accueil durant mon séjour à Rennes. Remerciements sincères également à ton équipe qui m'a très bien accueilli. Ces deux semaines et la collaboration entre nos labos ont été extrêmement formatrices. En bref, une opportunité en or pour enfin rencontrer le pionnier du FLIM français. Grace à toi j'ai pu toucher le transdisciplinaire et m'intéresser davantage au pouvoir des chiffres, en FCS. Je me souviendrai de nos discussions, qui m'ont permis de comprendre la FCS et le FLIM plus en profondeur. Merci pour ta bienveillance et ton sourire, notamment quand je me suis retrouvé bloqué à la gare. Finalement, Rennes est une ville sympathique, mais je tiens quand même à préciser que lorsque je me suis rendu au Mont Saint-Michel, un panneau attestait que j'étais en terres Normandes! J'aurais beaucoup apprécié revenir une seconde fois avec les manips ARN et j'espère que je pourrai venir à nouveau discuter microscopie avec toi.

Je voudrais également remercier **Barbara Testoni** et **Fabien Zoulim** pour leur collaboration qui m'a permis de publier mon premier article. Mes sincères remerciements à **Franck Amblard** et **Raymond F. Schinazi** pour leur collaboration sur ce nouvel inhibiteur tout à fait passionnant. Merci également à **Roxane Lemoine** et à la plateforme BCR pour le tri de nos cellules qui a conduit à de magnifiques images de MET. Merci à **Clovis Tauber** pour les analyses d'images des agrégats de core.

Je voudrais également remercier **Christophe Hourioux** pour ton aide apportée en biologie moléculaire, ta bonne humeur et tes blagues à chaque fois que tu entre dans le bureau des thésards. Egalement, j'aimerais remercier **Philippe Chouteau** pour sa disponibilité et ses conseils dans nos essais de manip. Merci à **Eric Piver**, **Martine Braibant, Emmanuelle Blanchard** et **Francis Barrin** pour leur présence et leurs conseils pertinents et avisés au cours des réunions de laboratoire. Des remerciements en chantant pour **Denys Brand.** Vous m'aurez bien surpris au cours de ces 3 ans et demi, et promis je mettrai ma blouse. J'essaierai aussi d'arrêter de chanter trop fort mais ça je ne peux pas vous le promettre, et puis je suis certain

que vous appréciez ma douce voix. Merci finalement à **Catherine Gaudy-Graffin**, à la fois pour ton sourire et ta gentillesse, mais aussi pour les discussions sur l'Asie que nous avons pu avoir. Je te remercie pour ton implication et ton intérêt dans nos travaux.

Je tiens ensuite à remercier tout le personnel de la plateforme de microscopie, sur laquelle j'ai passé beaucoup de temps. **Julien Gaillard**, merci à toi pour ta gentillesse, « t'inquiète pas moi un jour j'ai cassé un couteau qui coutait super cher », les heures de discussions sur les jeux vidéos, les concerts, la découverte du RP. Je rejouerai à DOTA, n'oublie pas notre deal ! Merci à toi et à **Christelle** pour votre accueil et ces soirées inoubliables. J'attends notre prochain RP ! Merci à **Guy**, pour le « curry de F** » déjà mais pour tous ces moments de discussion bio-informatique ou j'essayais de décoder le langage Guynaire en français. Merci pour ta gentillesse et ta disponibilité lors de mes soucis de bio info. De toute façon on se revoit sur le NET avec Julien, on doit se mettre à DOTA ! Merci à **Isabelle** pour ta gentillesse et toutes ces réservations. Merci également à **Sonia** pour ton humour et ta gentillesse quand on venait t'embêter avec Guy. De façon générale merci à tout le personnel pour votre bonne humeur, votre bienveillance et votre humour !

Mes remerciement également à **Agnès Petit**, qui m'a permis de dispenser quelques cours en licence, et qui a su être bienveillante avec nous qui débutions dans ce domaine complexe qu'est l'enseignement. En parallèle, je souhaite remercie **Denis Rasschaert** sans qui je pense que je ne serais pas là. Vous avez su me transmettre la passion de la virologie, et vos cours resteront mythiques, pas seulement pour moi, mais également pour des générations entières d'étudiants.

Merci à **Angélique** pour les bons de commandes à gogo, les conférences, les réservations d'hôtels, et j'en passe. Ta rigueur financière est exceptionnelle et tu m'as bien dépanné à de nombreuses reprises. Merci pour ton sourire et tes explications sur comment correctement passer une commande, j'aurai fini par en réaliser quelques-unes comme un grand ! En revanche, je me souviendrai que tu m'as vendu à Denys à propos de mes dessins haha ! Je sais que tu ne les apprécies pas, mais ne t'inquiète pas, dans 10 ans ils vaudront au moins 150 000 euros par post-it ! Je te souhaite une bonne continuation au sein de l'unité U1259.

Pléthore de remerciements à **Florian** pour tellement de choses. Tout d'abord pour ta formation dispensée en M2, puis pour toutes les autres qui ont suivi en thèse. Un énorme merci pour ton importante contribution dans tous mes travaux, qui ont abouti pour certains à des publications. Sans toi cette thèse n'aurait pas du tout eu l'allure qu'elle a aujourd'hui et je considère que cette thèse c'est aussi un peu de toi. Comme je l'ai cité plus haut, c'est avant tout un travail d'équipe. Tes qualités techniques mais également théoriques sont admirables, et je me demande bien pourquoi tu ne fais pas de thèse haha ! Quoiqu'il en soit je pense que tu as beaucoup de mérite et j'espère que les prochaines générations de thésards se rendront compte de la valeur d'une personne comme toi dans le laboratoire. Merci d'avoir toujours répondu présent pour mes nombreuses questions « à la c** », et même si tu ne nous aimes pas nous les thésards, de m'avoir écouté râlé, et parfois d'avoir râlé avec moi. Ne t'inquiètes pas tu arriveras à supporter Alain, au pire tu lui donnes quelques sédatifs et ça se passera bien. Ce fut un plaisir d'avoir exercé mon cynisme avec toi, et ne t'en fais pas, tu ne me manqueras pas, Monsieur Aigri.

Thomas, tout d'abord merci à toi pour ton soutien sans failles durant les soirées arrosées du laboratoire. Je n'oublierai jamais ton plus beau « Sac à m**** » lâché dans le bureau d'Alain et nos « super » musiques écoutées au confocal haha ! Sans oublier ton humour qui se rapproche du mien, parfois borderline, mais tellement drôle ! D'abord stagiaire puis thésard, je suis content que tu puisses à ton tour vivre cette expérience de la thèse, et j'espère que tout se débloquera dès cette année pour toi. Mais pour ça il va falloir que tu fasses encore plus de PCR, plus de bactério aussi. Tu as maintenant trouvé tes deux nouvelles passions ! Les soirées raid wow avec toi étaient bien sympas, et c'était vraiment cool de pouvoir parler de trucs de gamers au laboratoire ! Force et honneur à toi jeune paladin !

Alain, aussi connu sous le nom de **Meryl Streep**, merci à toi pour toute ton aide pendant ma thèse. Déjà sur toute ma biomol, et nos essais sans succès de manips. On aura quand même réussi à établir une PCR HBV plus sensible ! La grande question que j'ai pour toi Alain est… Mais qu'est-ce que t'as sous ton grand chapeau ? J'espère que cette superbe musique ne se perdra pas ! Nos discussions dans ton bureau étaient une véritable bouffée d'air, et la zone Alain qui contient aussi Thomas et Florian restera mythique au sein de l'U1259 ! Finalement rien qu'en y repensant « je ris à m'en faire crever ! ». Ne t'inquiète pas pour le départ des trois thésards d'un coup « Tu trouveras toujours d'autres fêtards, c'est si facile d'être un héros ! ».

Yannick, merci à toi pour tes conseils en western blot haha ! Grâce à tes conseils j'aurai fini par réussir à faire de beaux westerns (si si vraiment ! xD). On t'aura bien charrié sur tes origines

bretonnes, ton visage « rocailleux » et ta peau qui reflète le soleil tel un miroir ! Les discussions avec toi étaient intéressantes et ne t'inquiète pas je retiens les wombo combo que vous me mettiez avec Jade haha ! Après avoir fini le master ensemble, on aura aussi terminé la thèse, et j'espère que tu feras une belle soutenance. Kenavo et bon vent collègue !

Stéphanie, voilà que s'achève enfin le doctorat aux côtés d'Hugues. J'ai finalement beaucoup appris sur le VIH grâce à vous deux ! Merci à toi pour ton soutien et les conseils en microscopie électronique. TEM qui avait suscité ma curiosité à force d'en voir des images en réunion. Des félicitations sont de mises pour m'avoir supporté lorsque je râlais sur mes manips ARN qui ne fonctionnaient pas ainsi que mes brimades quotidiennes, cela t'aura fait les pieds haha ! Au final, il y aura eu plus de post-it à ton propos qu'au mien, d'ailleurs, Jade sera d'accord avec le fait que : « moi j'crois qu'il faut qu'vous arrêtiez d'essayer d'dire des trucs. Ça vous fatigue, déjà, et pour les autres, vous ne vous rendez pas compte de c'que c'est. Moi quand vous faites ça, ça me fout une angoisse... j'pourrais vous t***, j'crois. De chagrin, hein ! J'vous jure ce n'est pas bien. Il faut plus que vous parliez avec des gens.». Pour la bataille, je n'ai pas tenu les comptes, mais, le grand vainqueur c'est moi !

Jade, plus connue sous le nom de **grosse bouffe.** Je retiendrai les superbes taquets que tu m'as mis, et j'en prends de la graine, promis ! Je travaillerai un peu plus ma répartie pour la prochaine fois ! Merci à toi pour ces nombreuses pauses clopes au cours desquelles nous avons pu avoir des discussions scientifiques intéressantes, et des discussions complètement c**** aussi ouais. Bon, j'espère que tu finiras par être un peu moins en kit Ikea et que tu réussiras à guérir toutes tes blessures, dont ta superbe dernière en date. Au final on aura fini par rendre notre thèse, à peu près en même temps, et merci pour ton soutien au cours de ces dernières étapes de rédaction. On aura fini par venir à bout de toutes ces étapes administratives de l'enfer ! On l'a fait avec force et honneur ! Je te souhaite le plus beau futur qui soit dans ta carrière, parce que tu le mérite. Je te souhaite aussi les plus belles escapades à cheval, avec ta moitié aussi caractérielle que toi !

Elsa, notre petite Mexicana ! Merci à toi pour toutes nos petites discussions qui ont commencé à la réunion de rentrée des thésards. Ta gentillesse et ta patience ont été mises à rude épreuve avec moi, mais tu as toujours su rester bienveillante. J'admire cette bienveillance qui te caractérise et que tu gardes quelque soit la situation, et cela fait de toi une très belle personne. Merci pour tous ces moments où nous avons pu papoter sur nos manips, tu es, je pense, celle qui a reçu le plus de dessins de ma part, j'espère que tu en es fière, dans 10 ans cela vaudra de

l'or jajajaja ! Tu as fait une superbe thèse et un superbe pot de thèse ! Nous aurons bel et bien fêté ça comme il se doit, c'était MEMORABLE ! Merci d'avoir assouvi ma curiosité sur ta culture latine, et de m'avoir appris quelques mots, c'était parfois drôle mais en tous cas très intéressant ! Je te souhaite une bonne continuation et les plus beaux voyages !

Elodie, merci à toi pour ces nombreuses discussions et tes précieux conseils. Je dois te dire que ta rigueur scientifique et technique est juste admirable et, je n'en suis pas encore là, mais j'espère arriver à ton niveau de manip. Je me souviendrai de tes manips d'if à base de 3 polystyrènes de 1m sur 1m, c'était juste énorme ! Merci à toi pour ta gentillesse et ton fameux « ne t'inquiète pas, une thèse ça se fait toujours, plus ou moins dans la douleur, mais ça se fait », ces mots m'auront gardé motivé tout au long de ma rédaction et surtout à la fin !

Merci également à **Anne Beuuu**, **Lama-girl** pour ta bonne humeur et bravo pour avoir réussi à me supporter ! Je n'oublierai pas de sitôt ton excellente recette de brownie ! Je ne pourrai plus faire de beaux dessins sur ton mac, mais tu t'en souviendras je suis sûr. On notera tes talents aux fléchettes qui se sont affûtés avec le temps haha !

Manu, un grand merci pour ta gentillesse et ton implication dans le laboratoire. Nous étions bien perdus sans toi et tu nous as manqué. Je suis content que tu sois de retour, et te souhaite le meilleur pour la suite.

Mélanie, également connue sous le nom de la « voleuse de bureau ». Au final, on aura bien ri et j'aurai obtenu que tu changes de bureau, hélas, Anne m'a délogé. C'était agréable de vanner Alain et Florian avec toi, de te vanner toi aussi d'ailleurs parce qu'il n'y a pas d'exception à la règle.

Sébastien, notre médecin, mais aussi futur chercheur ! Merci pour ta gentillesse et tous ces petits moments de connivence. Je me souviendrai de ton habilité avec les chiffres lors de tes manips sur les inhibiteurs haha ! Je te souhaite une bonne continuation et j'espère que nous aurons à nouveau l'occasion de travailler ensemble.

Charline, nos expéditions de vulgarisation scientifique sont mémorables avec ce professeur si charismatique ! Finalement nous n'aurons pas pu voir le bout de cette expérience avec la Covid, mais c'était un plaisir de l'avoir fait avec toi. Je te souhaite le meilleur pour la suite dans les DOM-TOM !

Julie, merci pour ta gentillesse et ton sourire. Je te lègue Monsieur Thomas, il n'est pas facile mais ne t'inquiète pas il a un bon fond !

Merci **Lorena** et **Nancy** pour votre gentillesse à mon égard ! Je ne vous ai pas ménagé non plus, (non Lorena ne me dispute pas s'il te plaît jaja !) et merci à vous d'avoir apporté un peu de l'Amérique du sud avec vous. Je me souviendrai de tes bons gâteaux Lorena, et du cochon d'Inde de Nancy !

Marianne, les discussions avec toi sur tes expériences passées étaient vraiment intéressantes ! Je te souhaite toute la réussite informatique possible haha ! Prochaine étape : Zotéro ! Merci à toi pour tes petites anecdotes intéressantes sur la recherche à l'étranger.

Romu, merci à toi pour ces moments de détente dans le bureau avec Marianne et Amélie. Bon, je l'admets, cela peut porter à confusion avec des esprits tordus comme les vôtres, mais on s'est bien marré ! Ne t'inquiète pas, tu arriveras à placer « SexAI » comme enzyme de restriction dans un papier !

Amélie, ne t'en fais pas, j'arriverai à trouver de la répartie pour tes taquets du matin. En attendant, laisse-moi le temps de me réveiller et de manger à midi haha ! Quoiqu'il en soit merci à toi pour tes conseils techniques.

Anne Bull, je te remercie pour tes coups de main sur mes manips de RIP. Je me souviendrai de ta gentillesse mais aussi de la fois où tu m'as choqué en m'envoyant une vanne en express. Quoiqu'il en soit, bonne continuation à toi.

Mathilde, merci beaucoup pour ton soutien et tes conseils sur les dernières étapes de la rédaction. Tu as su me supporter dans le moment le plus difficile de ma thèse haha ! Je te souhaite le meilleur pour la suite hypoxique !

Nathan, merci pour tes conseils exceptionnels sur comment placer le mot « Koala » dans sa thèse !

Julien M. je te remercie pour l'aide que tu m'as apporté au début de ma thèse sur les premières stratégies de mutations, mais également pour ces discussions intéressantes sur HBV et les thérapies actuelles. **Karl**, je n'oublierai pas que sous ton caractère calme tu as su « calmer les doctorants de première année », beau travail, haha !

Aurélie, je ne sais pas encore si je dois te remercier pour ces fois ou je t'ai entendu chanter/hurler du Disney, notamment au P3. Je me souviendrai notamment de la fameuse anecdote de l'andouillette !

Florentin, un grand merci pour tous les renseignements sur l'enveloppement, mais également sur ce que tu fais en ce moment sur l'ADNccc. Je te souhaite le meilleur pour la suite, qui, à ce que je vois, a déjà bien commencé.

Julien P. merci pour ta bonne humeur et ta curiosité toutes ces fois ou je t'ai montré des techniques. Notamment cette fois où, je t'ai montré le FLIM haha ! Tu es maintenant thésard et je te souhaite une excellente continuation.

À mes amis tout d'abord, **Guy** et **Antoine**, vous avez été là durant ces 10 longues années d'études, Guy, en progressant à l'université avec moi, Antoine, en compatissant à mes galères. Je pense que je n'aurais pas pu demander mieux que d'avoir des amis comme vous mais également comme **Paul, Toto, Jéjé, Tintin** ou encore **Alex**. Vous avez tous été présents quand j'avais besoin de me sortir la tête de la thèse, et je vous remercie pour cela. Merci à vous tous de m'avoir encouragé jusqu'au bout du bout, en supportant mes coups de g***** et en me motivant à chaque fois (presque tout le temps avec bienveillance et compréhension). Vous êtes géniaux ! Ne changez rien, en tout cas, moi je n'oublierai pas que vous étiez là.

Merci à l'association **Wukong Tours** pour votre soutien à tous : **Jeanne, JB, Franck, Thomas, Kévin, Maudio, Alysshonne, Laura, Chantelle, Laurence et tous les autres**. Depuis le master et pendant ma thèse, le Wushu aura été une partie importante de ma vie, que j'ai dû mettre malheureusement un peu de côté ces derniers temps. Je reviens très bientôt ! Merci à vous pour cette bonne humeur et cette passion commune. Merci pour les encouragements et votre curiosité pour mon futur métier.

À ma famille, **Papa, Maman, Nono, Nadège** et à mes frères et sœurs : **Ange, Amélie, Adonis, Nataniel, May-Lynn, Thibault.** Merci à vous d'avoir cru en moi, de m'avoir soutenu pendant ces 10 ans d'études, de m'avoir écouté me plaindre un nombre incalculable de fois, mais également de vous être réjouis avec moi quand j'étais tout excité par de nouvelles opportunités. Vous avez toujours été là quoiqu'il arrive et ce, même avant mes études, je ne vous remercierai jamais assez pour tout cela. Vous m'avez aussi aidé quand il fallait pour prendre des décisions, merci pour les beaux coups de pieds au c** qui m'ont remobilisé et m'ont remis au travail. J'aurai fini par achever le cursus universitaire avec la plus haute distinction (du moins je me le souhaite !). Enfin, j'espère que vous êtes fiers de moi, car moi je suis fier d'avoir des parents comme vous. Merci à mes grands-parents également, **Candida, Manuel, Bernard, Nadine, Jean-Pierre**.

À ma femme, **Yolène**, **Yuleen**, ou tant d'autres noms. Quand je pense que tout cela a commencé par le « je », qui, avec le « tu » s'est transformé en « nous ». Finalement, il est amusant de se rendre compte que l'université nous as vu grandir et évoluer ensemble, et ce, dès les premières années ou je venais mettre ta chambre sens dessus-dessous. C'est un chemin qui se termine, et un nouveau qui s'ouvre pour nous deux. Cependant, je me rappellerai que tout au long de ce chemin, tu m'as motivé, tu m'as récompensé, tu as aussi su me reprendre quand je commençais à perdre le Nord. Ce chemin universitaire, plus sinueux qu'on ne le pense, n'aurait juste pas été possible si je ne t'avais pas eu, toi, mon ancre pour m'empêcher de dériver vers des océans déchainés. Tu m'as vu dans tous mes états au cours de ces 10 années, et particulièrement durant cette thèse, tu as toujours répondu présente, à mes côtés, et ce, même à la toute fin quand je scandais toutes les 30 minutes « j'en ai marre !». Merci pour ces moments de détente que tu as réussi à m'imposer pendant la rédaction, et qui ont finalement été salvateurs. Tout simplement, merci pour tout ! Maintenant, j'espère devenir enfin docteur afin que nous puissions, tous les deux, voguer vers les nouveaux chapitres de notre vie, qui je le souhaite, seront plein de rebondissements.

Finalement, à **Sanda** et **Archimède** qui ont été d'un soutien sans faille (c'est le super pouvoir des animaux !), notamment Sanda qui a finalement accepté mes caresses haha ! Et à **Noob**, le plus beau de tous, le plus fier de tous, le plus délicat, le plus doux. Tu ne liras jamais ça (sauf Si B. Werber a raison !), mais je tiens à coucher sur le papier la preuve du soutien dont tu as fait preuve sans même le savoir pendant la rédaction et même avant. Symbole de ma réussite en master, et éponge à angoisse de ma thèse, merci gros chat.

Résumé

Quarante ans après sa découverte, le Virus de l'Hépatite B (VHB) est responsable d'environ 250 millions de porteurs chroniques dans le monde et fait partie des enjeux actuels de santé publique. Les infections chroniques sont responsables de cirrhoses et de carcinomes hépatocellulaires qui constituent la troisième cause de mortalité associée au cancer dans le monde. Les traitements actuels limitent la réplication virale mais ne permettent pas la guérison des patients chroniquement infectés en raison de la persistance d'une forme épisomale du VHB dans les cellules infectées : l'ADN circulaire covalamment clos (ADNccc). Il est par conséquent important de participer à l'étude de nouvelles cibles thérapeutiques afin d'établir des stratégies antivirales innovantes. Le VHB est constitué d'une capside essentiellement formée par la protéine HBc ou Core. Cette protéine est donc une des cibles privilégiées pour le développement de nouvelles molécules douées d'activités antivirales et capables de diminuer la quantité d'ADNccc. Les études *in vitro* ont permis d'en décrire les principales caractéristiques via des protéines cores produites chez E.coli. Dans ces modèles, le domaine N-terminal est essentiel et suffisant pour l'assemblage de la capside. Cependant, très peu de données existent sur cet assemblage dans des cellules de mammifères compétentes pour la réplication d'HBV.

Les objectifs de ces travaux ont été de suivre l'assemblage, la localisation et le recrutement des partenaires viraux de la core par microscopie optique quantitative (FLIM, FCS) et microscopie électronique. Nous avons pu observer un assemblage rapide de la protéine core à une concentration submicromolaire, ce qui traduit une forte affinité. Nous avons également pu montrer par délétions ou mutations ponctuelles les rôles essentiels de domaines et d'acides aminés tel que le domaine C-terminal ou l'acide aminé Y132. Nous avons également cherché à suivre l'interaction core-ARN. Enfin ces travaux ont une application directe avec l'étude et la caractérisation d'antiviraux à action directe de différentes familles. La première classe montre la formation de matériaux amorphes accompagnés de structures cristallines tandis que la seconde classe n'aurait pas d'effet sur la structure mais altère le trafic intracellulaire de la capside.

Résumé en anglais

Forty years after its discovery, the Hepatitis B Virus (HBV) is responsible for an estimated 250 million chronic carriers worldwide and is one of today's public health challenges. Chronic infections are responsible for cirrhosis and hepatocellular carcinoma, the third leading cause of cancer-related death worldwide. Current treatments limit viral replication but do not cure chronically infected patients because of the persistence of an episomal form of HBV in infected cells: the covalently closed circular DNA (ccDNA). It is therefore important to participate in the study of new therapeutic targets in order to establish innovative antiviral strategies. HBV consists of a capsid that is essentially formed by the HBc or core protein. Therefore, this protein is one of the main targets for the development of new molecules having antiviral activities and which are able to reduce the amount of cccDNA. In vitro studies have made it possible to describe the main characteristics of this protein via core proteins produced in E. coli. In these models, the N-terminal domain is essential and sufficient for capsid assembly. However, very few data exist on this assembly in mammalian cells competent for HBV replication.

The objectives of this work were to follow the assembly, localisation and recruitment of viral core partners by quantitative light microscopy (FLIM, FCS) and electron microscopy. We were able to observe a rapid assembly of the core protein at a submicromolar concentration, which reflects a high affinity. We were also able to show by deletions or point mutations the essential roles of domains and amino acids such as the C-terminal domain or the amino acid Y132. We also sought to follow the core-RNA interaction. Finally, this work has a direct application with the study and characterisation of direct-acting antivirals of different families. The first class shows the formation of amorphous materials accompanied by crystalline structures, while the second class would have no effect on the structure but alters the intracellular traffic of the capsid.

Table des matières

Préambule 3

Données bibliographiques 31

I. Le virus de l'hépatite B 33

1. Découverte du virus de l'Hépatite B 33

2. Données cliniques du VHB 33

2.1. Modes de transmission 33

2.2. Aspect épidémiologique 34

2.2.1. Dans le monde 34

2.2.2. En France 35

2.3. Prévention 36

2.3.1. Vaccins 36

2.3.2. Autres 37

2.4. Histoire naturelle 37

2.4.1. Hépatite aigüe 38

2.4.2. Hépatite fulminante 39

2.4.3. Hépatite chronique 39

2.4.4. Le carcinome hépatocellulaire et la cirrhose 41

2.5. Modèles d'étude du VHB 42

2.5.1. Les lignées hépatocytaires HuH-7 et HepG2 43

2.5.2. Les cellules HepaRG 44

2.5.3. Hépatocytes primaires 44

2.5.4. Les hépatocytes dérivés de cellules souches 44

2.5.5. Les modèles animaux 45

II. Biologie du virus de l'hépatite B 47

1. Taxonomie 47

2. Génotypes 48

3. Structure des particules virales 50

3.1. Le virion 50

3.2. Les particules sous-virales (SVP) 50

3.3. Particules vides 50

3.4. Particules contenant de l'ARNpg 51

3.5. Capsides nues 51

4. Structure des composants viraux 52

4.1. L'ADN viral 52
4.2. L'ARNpg 55
4.3. Les glycoprotéines d'enveloppe 56
4.4. La protéine core : HBc 58
4.4.1. Le domaine N-terminal 59
4.4.2. Le linker ou espaceur 64
4.4.3. Le domaine C-terminal 64
4.5. La protéine pré-core : HBe 67
4.6. La polymérase : pol 69
4.7. La protéine X 70
4.8. La protéine HBSP 71
5. Le cycle viral 73
5.1. Attachement du virus à la cellule : liaison aux protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG) (Figure 17, A) 74
5.2. Entrée dans la cellule : l'interaction avec le récepteur NTCP (Figure 17, A). 74
5.3. Internalisation du virus (Figure 17, A, B) 74
5.4. Entrée dans le noyau (Figure 17, C, D) 75
5.5. La conversion de l'ADNrc en ADNccc (Figure 17, E) 77
5.6. La production des transcrits viraux (Figure 17, F) 78
5.7. La formation du complexe ARN pré-génomique / polymérase (Figure 17, F) 79
5.8. La formation de la nucléocapside 79
5.9. La rétro transcription de l'ARNpg en ADNrc 81
5.10. L'enveloppement 83
5.11. Rôle de l'autophagie et des corps multivésiculaires dans la morphogenèse 84
5.12. La voie alternative : le retour des nucléocapsides vers le noyau 85
III. Traitements 88
1. Les traitements actuels 88
1.1. Les immunomodulateurs 88
1.2. Les analogues nucléot(s)idiques (NUCs) 89
1.3. Les immunoglobulines dirigées contre l'hépatite B 91
2. Les traitements en cours de développement 91
3. Les inhibiteurs de type modulateurs allostériques de l'assemblage de la protéine core 92
3.1. Cible des CpAMs 94
3.2. Mécanistique 96
3.2.1. Site d'interaction et affinité de conformation 96
3.2.2. Effet des CpAMs sur l'assemblage de la capside 97

3.2.3. Effet des CpAMs sur les capsides préformées et sur les premières étapes de l'infection 99
3.3. Les résistances 100
3.4. Les inhibiteurs en essais cliniques 100
Projet de thèse 103
Objectifs de thèse : 105
Matériel et méthodes : 106
I. Constructions plasmidiques 106
1. Construction des pHBV1.1ΔC 106
2. Construction du plasmide pHBV1.1MS2 et pHBV1.1ΔCMS2 106
3. Construction des mutants HBcY132A et HBcF97L 107
4. Construction des mutants HBc3A, HBc3E, HBc7A, HBc7E 108
II. Culture cellulaire 108
III. Western Blot 109
IV. Hybridation *In Situ* en fluorescence. 110
V. Microscopie électronique 110
VI. Microscopie confocale, FLIM et FCS 111
Résultats et discussions 115
Partie 1 : Assemblage de la capside du virus de l'Hépatite B 117
I. Etude des domaines essentiels pour l'assemblage du virus de l'Hépatite B 117
1. Introduction et présentation des résultats obtenus 117
2. Manuscrit 126
II. Etude de résidus impliqués dans la morphogenèse du VHB 145
1. Introduction 145
2. Présentation des résultats obtenus 145
III. Etude de l'effet de la charge du domaine C-terminal sur l'assemblage 153
1. Introduction 153
2. Présentation des résultats obtenus 153
IV. Discussion sur l'assemblage de la capside du virus de l'hépatite B 155
Partie 2 : Etude de la formation du complexe tripartie formé par la core, l'ARN pré-génomique et la polymérase 160
1. Introduction 160
2. Présentation des résultats obtenus 160
2.1. Détection de l'ARN pré-génomique 160
2.2. Détection de l'interaction entre la core et l'ARN pré-génomique. 162
Discussion sur l'étude des interactions entre la core et l'ARNpg. 168

Partie 3 : Etude de modulateurs allostérique de l'assemblage de la capside du virus de l'Hépatite B 170
I. Etude d'un inhibiteur de classe I : Le BAY 41-4109 170
1. Introduction et présentation des résultats 170
2. Manuscrit 177
3. Résultat complémentaire de l'inhibiteur BAY 41-4109 186
II. Etude d'un inhibiteur de classe II 187
III. Discussion sur l'étude des CpAMs 192
Conclusion 197
Appendice 221
Productions scientifiques : 223
Présentation des travaux lors de congrès : 223

Liste des abréviations

Aa = Acide aminé

ADNccc = Acide désoxyribonucléique circulaire clos covalent

ADNrc = Acide désoxyribonucléique relaché circulaire

AgHBs = Antigène HBs

AgHBe = Antigène HBe

ARNpg = Acide ribonucléique pré-génomique

ARNm = Acide ribonucléique méssager

CHH = Carcinome hépato-cellulaire

CpAM(s) = Modulateurs allostériques de l'assemblage de la protéine core (du VHB)

CRS = Signal de rétention cytoplasmique

CTD = Domaine C-terminal

HAP = Hétéroarylpyrimidine

HAT = Histone acétyltransférase

HBc = Protéine core du virus de l'hépatite B

HDAC = Histone déacétylase

HDMT =Histone déméthylase

HMT = Histone méthyltransférase

HSP = Protéine de choc thermique

HSPG = Protéoglycanes à héparanes sulfates

IFN = Interferon

ISG = Interferon-Stimulated Genes, Gènes stimulés par l'interferon.

MET = Microscopie électronique à transmission

NLS = Signal de localisation nucléaire

NES = Signal d'export nucléaire

Nt = Nucléotide(s)

NTCP = Polypeptide cotransportant sodium/taurocholate

NTD = Domaine N-terminal

Pol = Polymérase

PPA = Phenylpropénamides

PRE = éléments de régulation post-transcriptionnels

RE = Reticulum endoplasmique

RRL = Lysat de réticulocytes de lapins

SBA = Sulfamoylbenzamides

SVP = Particules sous-virales

VHB = Virus de l'Hépatite B

VIH = Virus de l'immuno-déficience humaine

Table des matières des figures

Figure 1 : Prévalence de la population mondiale pour l'antigène HBs. 35
Figure 2 : Histoire naturelle de l'infection par l'hépatite B. 38
Figure 3 : Evolution des marqueurs de l'hépatite B chronique au cours de son histoire naturelle. 41
Figure 4 : Carte de la distribution des génotypes du VHB dans le monde. 49
Figure 5 : Structure des particules de Dane et des particules sous-virales observées à partir de *sera* de patients infectés. 52
Figure 6 : Représentation de l'organisation du génome du virus de l'hépatite B. 54
Figure 7 : Schéma de la structure de l'ARNpg. L'ARNpg est constitué d'une coiffe, de deux tiges-boucles en 5' et 3', d'un signal d'encapsidation PS1, PS2 et PS3 et d'une région PRE. 56
Figure 8 : Organisation des transcrits des protéines d'enveloppe et des protéines enchâssées dans la membrane virale. 58
Figure 9 : Organisation de la protéine core, aussi appelée HBc, de 21kDa. 59
Figure 10 : Représentations tridimensionnelles des structures tertiaires et quaternaires de la protéine core. 61
Figure 11 : Structure de la capside du VHB de symétrie T=3. 63
Figure 12 : Représentation tridimensionnelle des résidus de core impliqués dans l'enveloppement : le MBD. 64
Figure 13 : Schéma récapitulatif des rôles du domaine C-terminal de la core et de la bibliographie associée. 67
Figure 14 : Processus de synthèse de l'antigène HBe. 69
Figure 15 : Organisation de la polymérase du VHB. 70
Figure 16 : Epissage et traduction de l'ARNm de la protéine HBSP. 72
Figure 17 : Schéma du cycle viral du VHB. 73
Figure 18 : Schéma de la conversion de l'ADNrc en ADNccc. 77
Figure 19 : Rétro-transcription de l'ARN pré-génomique. 82
Figure 20 : Schéma de l'activité de transfert de brin de la core suggérée par Patel et al. 83
Figure 21 : Schéma des mécanismes possibles pour l'activation transcriptionnelle et la maintenance de l'ADNccc par la protéine core (HBc). 86
Figure 22 : Schéma du cycle viral et des étapes visées par les inhibiteurs actuels et en cours d'essais cliniques. 94
Figure 23 : Représentation des résidus impliqués dans la formation de la poche hydrophobe d'HBc. 95
Figure 24 : Représentation tridimensionnelle de l'interaction entre la protéine core et les CpAMs. .. 97
Figure 25 : Schéma du mode de fonctionnement des CpAMs. L 99
Figure 26 : Exemples d'inhibiteurs de types modulateurs allostériques de l'assemblage du VHB. 102
Figure 27 : Tableau récapitulatif des amorces utilisées. 108
Figure 28 : Imagerie de l'oligomérisation d'HBc et des dérivés d'HBc. 120
Figure 29 : Histogrammes des efficacités de FRET en fonction du temps post-transfection. 121
Figure 30 : Analyse de la formation des particules d'HBc ou des dérivés d'HBc par spectroscopie de corrélation de fluorescence. 123
Figure 31 : Immunomarquage par des billes d'or d'HBc et des dérivés d'HBc observé en microscopie électronique. 125
Figure 32 : Analyse par western blot de l'expression des mutants F97L et Y132 et de leurs homologues fluorescents. 146
Figure 33 : Les mutations F97L et Y132A ne modifient pas le phénotype de la core. 147
Figure 34 : Effet des mutations sur l'efficacité de FRET. 149

Figure 35 : Images de microscopie électronique à transmission d'HBc et ses mutants révélés par un immunomarquage aux billes d'or……150
Figure 36 : L'efficacité de FRET est partiellement restaurée par la complémentation en protéine sauvage. 152
Figure 37 : Efficacité de FRET des différents mutants mimant la phosphorylation. 154
Figure 38 : Observation par microscopie confocale de l'ARNpg après marquage par FISH de cellules HepAD38. 161
Figure 39 : Observation par microscopie confocale de l'ARNpg du VHB en cellules HuH-7 transfectées. 162
Figure 40 : Colocalisation de la protéine core et de l'ARNpg observée par immunofluorescence et FISH. 163
Figure 41 : Reconstitution de l'eGFP fusionnée à la core par BiFC. 165
Figure 42 : Schéma théorique du fonctionnement de la TiFC pour l'étude de l'interaction HBc-ARNpg. 167
Figure 43 : Expérience d'immunofluorescence sur des cellules HuH-7 exprimant la protéine HBc traitées par le BAY 41-4109. 172
Figure 44 : Vues orthogonales en x-y, x-z et y-z montrant la colocalisation entre les agrégats d'HBc et le noyau……174
Figure 45 : Les agrégats induits par le BAY 41-4109 sont observés par microscopie électronique après immunomarquage. 175
Figure 46 : Images de microscopie électronique des agrégats induits par le BAY 41-4109. 176
Figure 47 : Le traitement de cellules HuH-7 transfectées par le pHBc-WT avec le BAY 41-4109 n'aboutit pas à la dégradation d'HBc. 186
Figure 48 : Le GLP-26 n'induit pas de dégradation de la protéine core. 188
Figure 49 : Le GLP-26 provoque un phénotype d'accumulation cytoplasmique en contexte réplicatif. 190
Figure 50 : Analyse des capsides traitées par le GLP-26. 191

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I. Le virus de l'hépatite B

1. Découverte du virus de l'Hépatite B

Historiquement, les hépatites furent décrites pour la première fois dans la région du Sumer au 3ème millénaire avant J.-C. sur des tablettes d'argile. Appelé « Ahhazu » par les indigènes, l'agent étiologique était responsable d'hépatites fulminantes, et décrit comme étant un « démon attaquant le lieu de résidence de l'âme », le foie. Plus tard, Hippocrate fût le premier à utiliser le terme Ictère, synonyme de jaunisse, pour décrire ces pathologies. Après de nombreuses épidémies à travers le monde et les âges, les hépatites eurent un effet dévastateur au sein des troupes armées de la seconde guerre mondiale. Des suites de celles-ci, une série d'études furent engagées, et les premières souches appelées « MS-1 » et « MS-2 » furent isolées à partir du sérum du patient M.S. pendant ses deux accès hépatiques. Ces deux souches furent plus tard identifiées comme étant respectivement du virus de l'hépatite A et B. La suite des évènements fût le résultat de la sérendipité du Dr. Blumberg et d'un technicien de laboratoire du NIH. Ces derniers étudiaient le polymorphisme protéique des sérums de patients quand ils reçurent un sérum de patient australien aborigène. Croyant découvrir une nouvelle lipoprotéine, la suite de leur expérimentation les conduisit à l'appellation « Australian antigen » (Au), et à la corrélation entre celui-ci et les hépatites virales. En parallèle le Dr. Okochi de l'hopital universitaire de Tokyo travaillait sur l'antigène présent dans le sang de patients infectés. Reliant ces deux travaux, le Dr. Prince fût alors le premier à établir formellement le lien entre l'antigène et l'hépatite virale puis le Dr. Dane décrivit pour la première fois la particule éponyme de 42nm de diamètre, correspondant au virion de l'hépatite B. Le Dr. Blumberg établit alors le concept et la faisabilité du vaccin, qui fût développé par l'équipe de Philippe Maupas à Tours (Maupas et al. 1976; Trepo 2014; Purcell 1993).

2. Données cliniques du VHB

2.1. Modes de transmission

Le virus est contenu dans différents liquides biologiques, comme la salive, les larmes, les urines etc. Sa concentration est plus particulièrement élevée dans le sang avec jusque 10^{12} virions/mL, et dans le sperme ou les sécrétions vaginales à 10^{6-7} virions/mL. Par conséquent, celui-ci est transmissible par transmission horizontale lors de rapports sexuels. La transmission par contact avec les liquides biologiques a également été rapportée, ainsi il est vivement conseillé aux familles proches de patients infectés de se faire vacciner afin d'éviter tout risque de transmission intrafamiliale. Ce risque est particulièrement augmenté lors d'une promiscuité

importante. La transmission parentérale peut être observée chez les usagers de drogues par échange de matériel d'injection contaminé mais également lors de transfusions par du sang infecté ou encore de greffes. Enfin la transmission verticale de la mère à l'enfant lors de l'accouchement ou *In Utero* est aussi importante, et cause la majorité des infections dans les pays à forte endémie. Cette transmission est, dans les pays développés, prévenue par une prise en charge adaptée de la mère et de l'enfant lors de l'accouchement, notamment par la vaccination précoce et l'injection d'immunoglobuline à l'enfant dès la naissance (MacLachlan et Cowie 2015).

2.2. Aspect épidémiologique

2.2.1. Dans le monde

Le virus de l'hépatite B est particulièrement marqué par sa forte infectivité (100 fois plus infectieux que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) selon l'OMS). En 2015, l'organisation mondiale de la santé estimait à 1.34 milliards, le nombre de morts causées par les hépatites virales. Ce chiffre reste croissant, renfloué par les 257 millions de patients estimés pour l'infection chroniques au VHB, et les 71 millions de patients infectés chroniquement par le virus de l'hépatite C. Ainsi 66% des décès imputables aux hépatites virales sont le résultat de complications de l'hépatite B chronique (WHO 2017).

L'hépatite B est répartie inégalement autour du globe. Les pays sont ainsi classés en fonction de la proportion de personnes séropositives pour l'antigène HBs (AgHBs ; Figure 1). Les pays dits à « haute prévalence », supérieure à 8%, sont principalement répartis en Afrique subsaharienne, en Asie du sud-est, et à l'extrême nord de l'Amérique. Les pays à séroprévalence intermédiaire, entre 2 et 7%, sont quant à eux répartis sur la péninsule ibérique, l'est de l'Europe, dans le reste de l'Asie et de l'Afrique ainsi qu'en Amérique du sud. Enfin les pays à faibles séroprévalence sont minoritaires et incluent l'Europe de l'ouest et du nord, le Japon, quelques pays d'Amérique du sud et d'Asie, et l'Amérique du nord (CDC, 2012).

Les pays à prévalence élevée représentent 45% de la population mondiale et souffrent généralement d'une forte transmission verticale. Dans ces pays, les femmes en âge de procréer sont fréquemment positives au VHB et, par conséquent, la vaccination des enfants à la naissance représente un moyen fiable et très efficace de réduire le taux d'infection au VHB. Les pays à prévalence intermédiaire représentent environ 40% de la population mondiale. Ces pays sont touchés par des transmissions verticales et horizontales mais à des proportions plus faibles. Enfin les pays à faible séroprévalence représentent une minorité de la population mondiale, soit

15%. Dans ces pays, dont fait partie la France, les travailleurs du sexe, les personnes sans abri, incarcérées ou encore les hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes sont généralement les populations les plus à risque. Une partie de la population infectée provient également de l'immigration depuis les pays à haute prévalence. Les individus infectés sont souvent des adolescents ou des adultes qui ont contracté l'hépatite B à la suite d'une transmission horizontale. Enfin, il est intéressant de noter que dans tous les pays, les populations indigènes, natives comme les maoris ou les aborigènes en Australie, sont toutes victimes d'une haute prévalence qui pourrait être due à un manque d'accès aux soins, une promiscuité importante, des rituels mortuaires impliquant la manipulation de sang, mais aussi aux grossesses plus précoces (Mahoney 1999; MacLachlan et Cowie 2015; Schweitzer et al. 2015).

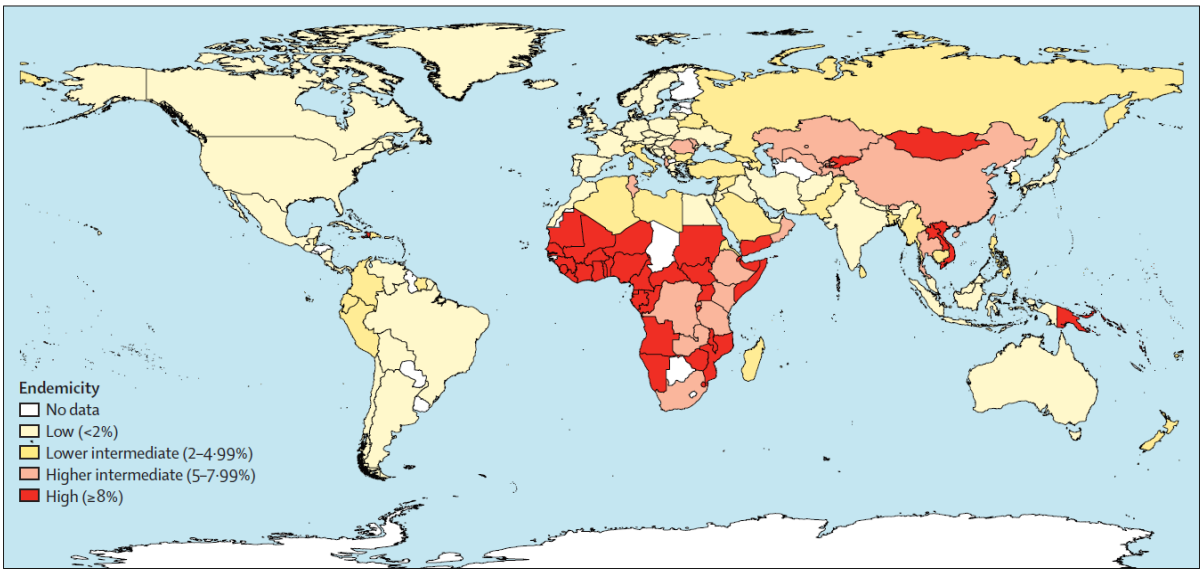


Figure 1 : Prévalence de la population mondiale pour l'antigène HBs. Les pays sont classés en faible prévalence (<2%) en jaune clair, prévalence intermédiaire (2-8%) en jaune et en saumon et prévalence élevée (>8%) en rouge. (Extrait de (Schweitzer et al. 2015))

2.2.2. En France

En France, une enquête menée par l'Institut national de Veille Sanitaire (InVS), la Caisse national de l'assurance maladie et des Travailleurs Salariés (CnamTS) et le Centre technique d'appui et de formation des centres d'examens de santé (Cetaf) a eu lieu en 2004. Cette enquête conduite chez les adultes a permis d'estimer environ 280 000 personnes chroniquement infectées, dont seulement 45% étaient conscientes de leur positivité, et 3.1 millions de personnes ayant été en contact avec le VHB (Caisse nationale de l'assurance maladie des travailleurs salariés (France) et al. 2007). En 2016, le volet virologique du baromètre santé a permis d'estimer 135 000 personnes chroniquement infectées dont seulement

17,5% connaissaient leur statut, une baisse qui bien que non significative pourrait être due aux critères d'inclusion de l'enquête, qui excluent populations marginales. En effet, seules les personnes francophones et sous couverture sociale étaient aléatoirement sélectionnées, de plus les populations sans domicile fixe sont complètement exclues de cette étude étant donné que le recrutement était réalisé par voie téléphonique. Toutefois cette nouvelle méthode se révèle tout autant originale qu'intéressante puisque basée sur l'envoi d'un kit d'auto-dépistage sanguin à domicile associé à une enquête téléphonique de grande ampleur (Saboni 2019).

A l'occasion des journées nationales de lutte contre les hépatites, un rapport daté de Juin 2017 a pu mettre en lumière de fortes disparités géographiques quant à la prévalence de l'hépatite B chronique. L'Ile de France se situe ainsi en tête avec 71/100 000 personnes infectées, dont la Seine Saint-Denis qui atteint un taux de 106/100 000, suivie par la région PACA avec 30/100 000 personnes concernées puis le Grand Est avec 27/100 000.

2.3. Prévention

2.3.1. Vaccins

L'OMS annonce dans son rapport global sur les hépatites de 2017 le taux de 84% de couverture vaccinale chez les enfants pour les trois doses, réduisant la prévalence du VHB infantile de 4.7% dans les années 80 à 2000 à 1,3% en 2015. Ce chiffre reste toutefois contrasté par son écart type ; la faible couverture vaccinale observée en Europe de l'Est et en Afrique aboutit à 3% de prévalence infantile (WHO 2017).

La première génération de vaccins fut mise au point en 1976 par le professeur Maupas à Tours (Maupas et al. 1976). Initialement basée sur la purification d'antigènes HBs à partir de sang de patients chroniquement infectés par le VHB, celle-ci fut vastement utilisée avant la création de vaccins recombinants. Ces vaccins sont désormais commercialisés sous forme monovalente ou combinée, produits en levure *S. cervisiae.* L'organisation mondiale de la santé recommande l'utilisation de trois doses chez les enfants les protégeant à vie. L'objectif pour 2030 est d'augmenter la couverture vaccinale à 90% afin d'éliminer l'hépatite B (WHO 2016).

Le vaccin contre l'hépatite B est en France hexavalent, combiné avec les vaccins contre le tétanos, la diphtérie, la coqueluche, la poliomyélite, et *Haemophilus influenzae*. La vaccination est en France obligatoire depuis le 1er Janvier 2018 et faite à 2 mois, suivie de deux rappels à 4 et 11 mois. Le vaccin monovalent est quant à lui injecté dès la naissance chez les nourrissons dont la mère est positive pour l'AgHBs, suivi de rappels à 1 et 8 mois. Afin de

limiter la transmission, la première injection est accompagnée d'immunoglobulines anti-HBs. La couverture vaccinale française des trois doses chez les enfants dépasse les 90% requis pour endiguer l'infection en 2016, 2017 et 2018 (Site Santé Publique France, source Drees). Cette valeur est très hétérogène au sein du territoire. Un gradient Nord-Sud marqué est observé, avec entre 85 et plus de 90% de couverture pour certains départements du nord contre une faible couverture pouvant descendre sous les 75% dans le sud. Les régions les plus touchées par l'hépatite B sont toutefois couvertes à plus de 90% (« Surveillance des hépatites B et C » 2017).

2.3.2. Autres

En parallèle de la vaccination, qui reste le moyen le plus efficace d'éliminer l'hépatite B, d'autres méthodes de prévention ne sont pas à négliger. Ainsi, l'OMS publie en 2016 l'objectif pour 2030 sur plusieurs aspects : 90% de vaccination à la naissance en prévention des transmissions mère-enfant (38%, 2015), 100% de sécurité sur les dons de sang (89%, 2015), 90% de sécurité sur les dispositifs d'injection par l'utilisation d'outils appropriés (5%, 2015), et enfin le don de 300 seringues stériles aux usagers de drogues par personne et par an contre 20 en 2015 (WHO 2016). De même, la prévention de la transmission de l'hépatite B repose sur l'utilisation de préservatifs lors des relations sexuelles, l'absence de partage d'objets d'hygiène personnelle pouvant être source de coupures ou de saignements (rasoirs, coupe-ongles, brosse à dents..) et la réalisation de tatouages ou piercing avec du matériel stérile ou à usage unique.

2.4. Histoire naturelle

Le virus de l'hépatite B est un virus à tropisme hépatocytaire. Après sa transmission, le virus va pouvoir entrer et se multiplier dans les cellules du foie, ce qui va engendrer une hépatite aigüe. L'infection se poursuit par soit une résolution de l'infection dans la majorité des cas, soit par l'établissement de la chronicité chez 5% des adultes. Lors de la chronicité, le foie est gravement endommagé, ce qui provoque une cirrhose et/ou un carcinome hépatocellulaire. Ces lésions du foie ne sont pas provoquées directement par le virus, qui n'est pas lytique, mais par le système immunitaire, qui va réagir à la présence du pathogène en détruisant les hépatocytes infectés. L'évolution de la pathologie dépend quant à elle de paramètres immunitaires et virologiques, et sera décrite dans les paragraphes suivants et dans la figure 2.

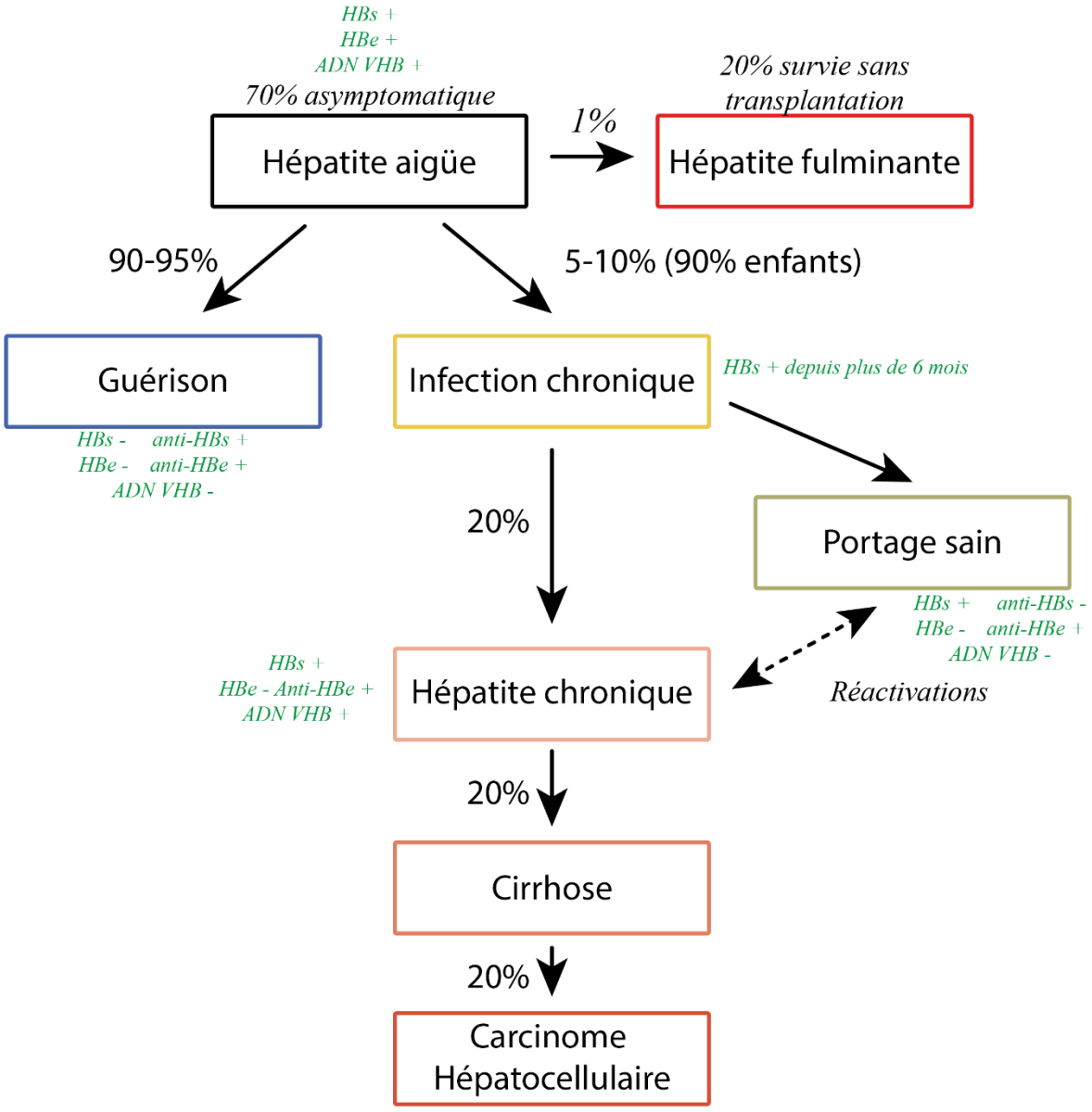


Figure 2 : Histoire naturelle de l'infection par l'hépatite B. Les marqueurs sérologiques sont indiqués en vert : antigène HBs, antigène HBe, ADN viral, anticorps dirigés contre l'AgHBs, anticorps dirigés contre l'AgHBe (adapté de (S. Pol 2006)).

2.4.1. Hépatite aigüe

L'hépatite aigüe se caractérise par l'apparition de symptômes chez 15% des patients après 10 semaines d'incubation en moyenne. La probabilité d'apparition de symptômes augmente avec l'âge des patients infectés. Classiquement, les premiers symptômes ont lieu au cours de la phase pré-ictérique avec des nausées, une asthénie et une anorexie pendant 3 à 7 jours. Puis la phase ictérique apparait, avec un jaunissement de la peau durant 2 à 3 semaines. Le taux d'ADN viral augmente jusque 10^8-10^9 copies par mL avant de diminuer. Au cours de l'infection, l'antigène HBs est détectable en moyenne 3 semaines avant l'apparition de

symptômes, tout autant que l'antigène HBe qui apparaît peu avant l'ictère puis disparaît rapidement avec l'arrivée d'anticorps spécifiques. Les anticorps anti-HBs neutralisant sont quant à eux détectés tardivement, 1 à 6 mois après l'infection, lorsque les anticorps anti-HBc, sont rapidement détectés dès les premiers symptômes sous formes d'IgM, marqueurs de l'infection récente, qui persistent durant l'infection. Lors de la guérison, les anticorps anti-HBc passent alors sous forme d'IgG. La résolution de l'infection est dépendante d'une combinaison d'activités cytolytiques et non cytolytiques : l'établissement de lymphocytes T CD8+ nécessaires à la destruction d'hépatocytes infectés par les interféron-γ et les TNF (« tumor necrosis factor »), de lymphocytes B produisant des anticorps neutralisants spécifiques, et de lymphocytes T CD4+ supportant les mécanismes immunitaires. L'absence d'AgHBs et d'AgHBe, et l'apparition d'anticorps neutralisants anti-HBs, anti-HBe et anti-HBc signent la résolution de l'infection et donc la guérison. Au contraire, la persistance d'antigènes HBs au-delà de 2 mois doit être suivie et peut être signe d'un passage à la chronicité (S. Pol 2006; M.-F. Yuen et al. 2018).

2.4.2. Hépatite fulminante

L'hépatite B aigüe symptomatique peut se compliquer en une hépatite fulminante dans 1% des cas. Cette complication peut survenir dans les 15 jours à 3 mois après les premiers symptômes ictériques et provoque une destruction massive du parenchyme hépatique. Le foie devient alors dysfonctionnel et des substances toxiques normalement éliminées s'accumulent dans le sang. Celles-ci vont pouvoir atteindre le cerveau et provoquer une encéphalopathie hépatique. Sans transplantation hépatique, le taux de mortalité atteint 80%, en revanche en cas d'évolution favorable, l'hépatite ne passe généralement pas à la chronicité.

2.4.3. Hépatite chronique

Le passage à la chronicité est définit par la présence d'AgHBs au-delà de 6 mois après l'hépatite aigüe. Il a lieu dans 90% des cas chez les enfants du fait de l'immaturité de leur système immunitaire, et dans 30 à 100% des cas chez les adultes immunodéprimés. A contrario, chez les adultes immunocompétents, seulement 5 à 10% d'entre eux contracteront une hépatite B chronique. Outre l'âge, des facteurs virologiques sont également en cause, ainsi la production de particules sous-virales HBs en quantité 1000 fois supérieure à la quantité de virions agit comme un leurre immunologique prévenant une réponse immunitaire appropriée contre l'infection. Cette production massive d'HBs qui participe également à l'épuisement des cellules

T, est accompagnée de nombreux rôles des protéines virales dans l'inhibition de la réponse immunitaire innée. Une réponse adaptative dirigée contre les antigènes HBe et HBc est favorable à la résolution de la pathologie. La chronicité se caractérise par l'alternance de phases d'arrêts de la réplication virale et de réactivations, pouvant conduire à la cirrhose et/ou au carcinome hépatocellulaire (S. Pol 2006). La terminologie concernant les différentes phases de l'hépatite chronique a été changée, et par conséquent les termes « Tolérance immune » et « Clairance immunitaire » ont respectivement été remplacés par « Infection chronique HBe positive » et « Hépatite chronique HBe positive ». De même le terme de phase de « contrôle immunitaire » et de « réactivation virale » ont été remplacés par « Infection chronique HBe négative » et « Hépatite chronique HBe négative ».

Les étapes de l'hépatite chronique sont décrites une à une dans les paragraphes suivants et dans la figure 3 :

Tolérance immune : l'infection chronique HBeAg positive

Cette première phase est de durée variable, allant de quelques mois à quelques années. Le virus se multiplie beaucoup et l'inflammation est faible, ce qui résulte en des taux normaux de transaminases en corrélation avec une histologie hépatique normale. Cette phase est notamment très caractéristique des infections chroniques chez les enfants.

Clairance immunitaire : l'hépatite chronique HBeAg positive

La seconde phase est caractérisée par une élévation anormale des transaminases, témoins d'une destruction hépatocytaire médiée par l'activation de la réponse immunitaire cytotoxique. La multiplication virale est alors drastiquement réduite. Dans 10 à 20% des cas, une cirrhose ou un carcinome hépatocellulaire peut se développer depuis cette phase.

Contrôle immunitaire : l'infection chronique HBeAg négative

Au cours de cette phase, la multiplication virale est faible voire indétectable et les transaminases normales, témoins d'une amélioration de l'histologie hépatocytaire. Le corps a développé des anticorps dirigés contre l'antigène HBe, et l'infection est contrôlée. Chez quelques patients (0 à 1%), des anticorps dirigés contre l'antigène HBs peuvent être produits, ne protégeant toutefois pas du développement futur de cirrhose ou de carcinome hepatocellulaire. La majorité des patients chroniquement infectés se trouvent dans cette phase.

Réactivation virale : l'hépatite chronique HBeAg négative

A l'issu du contrôle immunitaire, une réactivation de la multiplication virale peut avoir lieu, la pathologie peut alors osciller entre des phases de contrôle et de clairance immunitaire. Généralement asymptomatique, cette réactivation peut avoir lieu après des épisodes d'immunodépressions en cas de greffe, de chimiothérapies ou encore d'infections (S. Pol 2006; M.-F. Yuen et al. 2018).

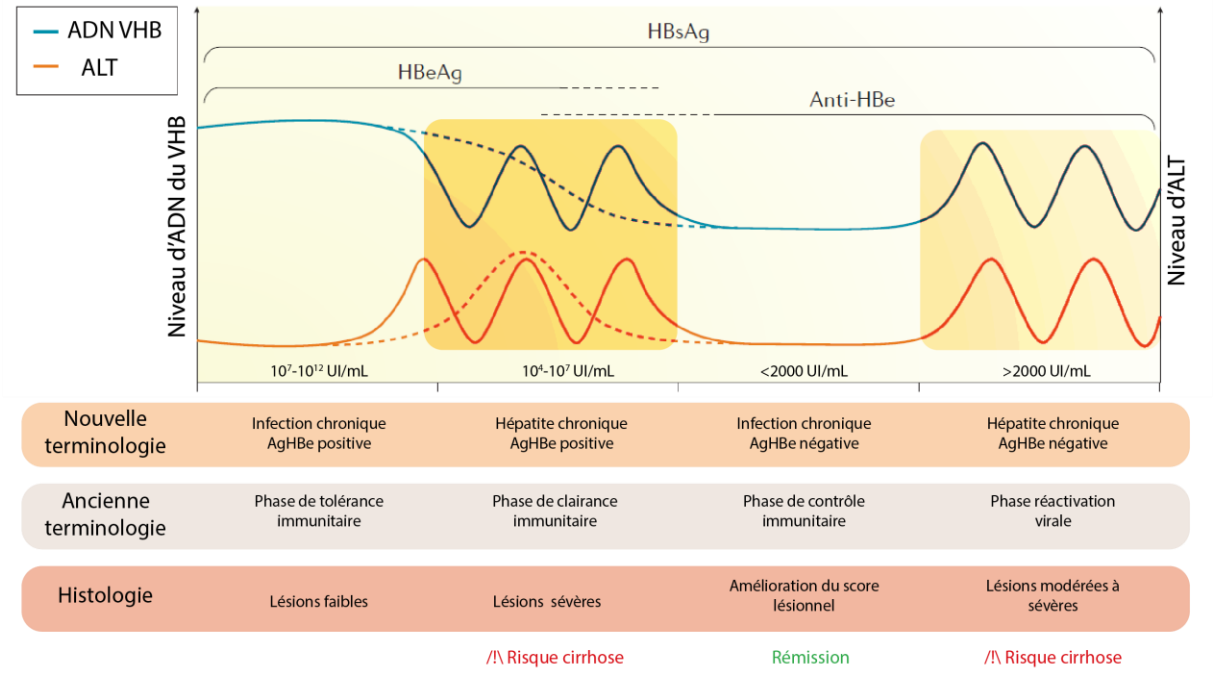


Figure 3 : Evolution des marqueurs de l'hépatite B chronique au cours de son histoire naturelle. Les différentes phases sont ainsi schématisées avec leur taux correspondant d'ADN viral et d'ALT. L'ancienne et la nouvelle terminologie sont également indiquées, et le niveau lésionnel est ajouté (Inspiré de (M.-F. Yuen et al. 2018)).

2.4.4. Le carcinome hépatocellulaire et la cirrhose

Les patients atteints chroniquement ont un risque accru à long terme de développer une cirrhose voire un carcinome hépatocellulaire (CHC). Les lésions hépatiques causées par la réponse immunitaire des lymphocytes T cytotoxiques et des cellules NK (natural killer) causent une nécrose cellulaire et tissulaire afin d'éliminer les hépatocytes infectés. Ces épisodes ont lieu durant le contrôle immunitaire mais également pendant la réactivation virale et vont conduire à une régénération anarchique des hépatocytes associés à une fibrose. Cette fibrose est présente dans les nodules de régénération et va constituer un tissu cicatriciel incapable d'assurer les fonctions hépatiques. Lorsque ce tissu est présent en trop grande quantité, on parle de

cirrhose : le foie perd ses fonctions. De nombreuses complications peuvent survenir, comme des hémorragies ou encore une sensibilité accrue aux infections, mais aussi des encéphalopathies hépatiques ou un carcinome hépatocellulaire (Chemin et Zoulim 2009).

Le carcinome hépatocellulaire est le 6ème cancer le plus commun au monde et la 3ème plus grande cause de mortalité associée aux cancers et est issu dans 80 à 90% des cas d'un foie cirrhotique. Il a été montré que les porteurs chroniques du VHB présentaient un risque 100 fois plus élevé de contracter un CHC. De la même façon, un taux sérique de plus de 10^4 copies / mL du génome du VHB est corrélé à la déclaration d'un CHC. La multiplication rapide des hépatocytes au cours des régénérations ainsi que la production de ROS (espèces réactives de l'oxygène) en réaction à l'inflammation sont des facteurs favorisant le développement du CHC. Des facteurs viraux sont également responsables du CHC, l'ADN viral peut notamment s'intégrer dans l'ADN cellulaire et causer des mutations par insertion. Les insertions du génome du VHB ou de fragments de génome peuvent altérer des gènes de prolifération (MAPK1, cycline A), de viabilité (Protéine 1 associée au récepteur des TNF), ou encore des gènes dont la dérégulation entraîne l'immortalisation (hTERT). Des gènes antiprolifératifs, dits suppresseurs de tumeurs, mais aussi des gènes prolifératifs (proto-oncogènes) sont ainsi altérés et l'accumulation de ces mutations provoque la multiplication anarchique des cellules et le cancer. Un deuxième facteur viral semble également impliqué dans la transformation des cellules et donc dans l'oncogenèse : la protéine X. Cette protéine est impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire et de l'apoptose, la survie et l'interaction avec des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN cellulaire. Ainsi des souris transgéniques exprimant la protéine X ont développé un CHC sans aucun autre facteur, ce qui renforce l'idée d'un rôle pro-oncogène (Teng 2016).

2.5. Modèles d'étude du VHB

Les modèles d'études ont pour prérequis de devoir mimer au plus proche l'infection naturelle par le VHB. Bien que le virus ai été découvert il y a une cinquantaine d'années, des étapes du cycle viral restent mal comprises. Des modèles adaptés permettent donc une étude adaptée du cycle mais également d'inhibiteurs du VHB. L'amélioration des modèles d'études en termes de similarité avec l'infection naturelle est intimement liée à l'augmentation de l'utilité et de la pertinence des résultats expérimentaux. Les modèles actuels i*n cellulo* et *in vivo* présentent tous des avantages ainsi que des inconvénients qui seront présentés dans les paragraphes suivants.

Les modèles *in cellulo* sont composés de deux types de lignées cellulaires : les lignées hépatocytaires issus d'hépatomes (HuH-7(-NTCP), HepG2(-NTCP), HepAD38, HepG2.2.15, HepaRG(-NTCP)) et les lignées d'hépatocytes primaires (PHH, PTH). Il existe également des lignées dérivées de cellules souches actuellement en cours de développement.

2.5.1. Les lignées hépatocytaires HuH-7 et HepG2

La lignée HuH-7 provient du prélèvement en 1982 d'un carcinome hépatocellulaire d'un japonais de 57 ans. La lignée HepG2 provient quant à elle du prélèvement en 1975 d'un hépatoblastome issu d'un individu caucasien de 15 ans. Ces lignées issues de tumeurs ne reproduisent donc que partiellement les fonctions physiologiques des hépatocytes. Elles ont également perdu leur susceptibilité pour l'infection au VHB de par la faible expression du récepteur NTCP à leur surface. Malgré ce défaut de permissivité, elles expriment un large panel de gènes hépatocytaires qui permettent l'étude du VHB. La transfection stable ou transitoire du génome du VHB sous forme plasmidique permet de contourner ce dernier problème. Leur utilisation est largement répandue et a permis l'étude de nombreux mécanismes et notamment de l'efficacité des antiviraux. Ces modèles permettent également de mimer les étapes tardives du cycle et de produire des particules virales infectieuses (Acs et al. 1987).

L'observation de ces virions infectieux a conduit à l'établissement de lignées exprimant de façon stable des particules virales. Ces dernières ont été obtenues en transfectant des cellules HepG2 avec des plasmides contenant le génome du VHB. L'ADN du VHB a ainsi été intégré dans le génome cellulaire et a abouti à l'obtention des lignées HepG2.2.15 et HepAD38. Ces cellules sont largement utilisées pour le dépistage de molécules antivirales et la production de particules virales infectieuses (Sells, Chen, et Acs 1987; Ladner et al. 1997).

La découverte du récepteur du VHB, le co-recepteur NTCP, a permis d'établir des lignées HuH-7 et HepG2 l'exprimant de façon stable (Yan et al. 2012). Ces modèles et principalement les HepG2-NTCP ont permis d'étudier les mécanismes d'entrée virale et le développement en conséquence d'inhibiteurs d'entrée comme le Myrcludex B. Ces modèles ont par exemple permis d'identifier le rôle de la glypicane-5 dans l'attachement du virus à la cellule ou encore celui du récepteur à l'EGF en tant que co-facteur (Iwamoto et al. 2020; Verrier et al. 2016; Allweiss et Dandri 2016). Néanmoins ce modèle nécessite l'utilisation de DMSO afin de polariser les cellules, de PEG et de haute multiplicité d'infection et reste donc imparfait.

2.5.2. *Les cellules HepaRG*

Les HepaRG sont des cellules isolées d'une patiente française ayant contracté un carcinome hépatocellulaire associé au virus de l'hépatite C. Ces cellules sont permissives pour l'infection du VHB après préparation. Afin de permettre ceci, elles doivent être différentiées par ajout de diméthylsulfoxide (DMSO) et d'hydrocortisone pendant 28 jours. Elle se différencient alors en cellules biliaires et en cellules hépatocytaires dites HLCs (« hepatocyte-like cells »)(Gripon et al. 2002). Ces cellules différenciées sont alors infectables, ce qui permet l'étude des étapes précoces du cycle viral. Un des avantages de l'utilisation de ces cellules est la persistance du VHB dans leur noyau sous sa forme épisomale : l'ADNccc (Hantz et al. 2009).

2.5.3. *Hépatocytes primaires*

Pendant longtemps le seul moyen d'infecter des cellules avec le VHB, les hépatocytes primaires sont une possibilité attractive étant donné que ce sont des hépatocytes directement issus de foie de patients. Ces cellules sont issues de résections hépatiques de zones saines réalisées afin d'enlever les lésions des foies de patients. Très facilement infectables, ces cellules sont néanmoins limitées de par l'absence de multiplication *in vitro* et leur durée de vie courte. De plus ces cellules perdent progressivement de leur caractère différencié et donc l'expression du récepteur NTCP au VHB,. Malgré l'apport exceptionnel de ces cellules pour l'étude du VHB, la variabilité génétique entre les donneurs biaise les résultats qui pourraient être obtenus (Allweiss et Dandri 2016).

Le virus de l'hépatite B du canard de Pékin a largement été utilisé en infectant des hépatocytes primaires de canard (PDH). Plus simple à mettre en œuvre, ces études ont permis l'identification de nombreux mécanismes des étapes précoces et de la formation de l'ADNccc. Néanmoins la distance génétique entre le virus de l'hépatite B du canard et de l'Homme ne rend pas transposable tout le savoir acquis en utilisant ce modèle.

2.5.4. *Les hépatocytes dérivés de cellules souches*

Malgré l'établissement de lignées cellulaires permissives pour l'infection au VHB, celles-ci sont éloignées physiologiquement des hépatocytes et l'utilisation d'hépatocytes primaires demeure limitée. Des modèles *in vitro* proches des PHH (Hépatocytes primaires humains) ont alors été développés. L'une des stratégies permettant de pallier à cet éloignement est l'utilisation de cellules embryonnaires capables de se différencier en n'importe quel tissu. Néanmoins les contraintes éthiques qui leur sont associées ne les rendent pas facilement

utilisables. En 2006, le professeur Yamanaka a développé une méthode de reprogrammation de cellules adultes différenciées en cellules souches pluripotentes induites (iPS) (Takahashi et Yamanaka 2006). Ces travaux ont été récompensés par le prix Nobel de médecine en 2012. Les iPS peuvent être différenciées en hépatocytes et permettent l'étude des différentes étapes du cycle du VHB dans des conditions proches des hépatocytes humains (Kaneko et al. 2016).

2.5.5. Les modèles animaux

Le chimpanzé est le modèle animal privilégié de par sa proximité génétique avec l'homme, sa susceptibilité à l'infection par le VHB et des profils cellulaires similaires à ceux de l'Homme lors du développement de l'hépatite chronique. Ce modèle a permet des études immunologiques cohérentes avec les profils humains et a donc été utilisé pour le développement de vaccins. Néanmoins leur utilisation coûteuse implique également des problèmes éthiques qui conduisent à l'approche via d'autres modèles. Le *Tupaia belangeri*, petit mammifère arboricole est susceptible à l'infection par le VHB et permet d'observer le développement d'une hépatite B chronique. Néanmoins l'infection n'est pas très efficace et le manque de lignées d'élevage limite leur utilisation. L'utilisation d'hépatocytes primaires provenant de cet animal a notamment permis d'identifier le récepteur NTCP (Yan et al. 2012).

Un autre mammifère est infectable par un équivalent du VHB : la marmotte. L'infection par le WHV aboutit à des infections chroniques et au développement de CHC (Allweiss et Dandri 2016). Il est également possible d'infecter le canard de Pékin, dont l'avantage de l'animal et de la lignée associée est qu'ils sont infectable par le DHBV qui peut évoluer en hépatite aigüe et chronique. Ce dernier se transmet de la cane au caneton via une transmission verticale. Simple d'utilisation et plus facile à entretenir, la plupart des mécanismes observés chez le DHBV ont été confirmé pour l'HBV (Plus d'informations : (Funk 2007)).

Le modèle murin reste par conséquent le plus utilisé, moins coûteux, plus abordable techniquement, mais pas infectable par le VHB. Différentes lignées murines ont alors été élaborées, modifiées génétiquement. Ces lignées transgéniques expriment le VHB complet ou une seule protéine du VHB. Il est également possible d'injecter des adénovirus servant de vecteurs viraux pour l'ADN du VHB aux souris. Ces souris vont alors exprimer le VHB, mais peuvent néanmoins produire une réponse immunitaire forte contre le vecteur, ce qui peut biaiser les conclusions sur l'immunopathologie associée. Pour contourner ce problème, il est possible d'effectuer des injections hydrodynamiques de grandes quantités d'ADN viral résultant en

l’absorption de cet ADN par les hépatocytes murins. Néanmoins cette méthode provoque des dommages hépatiques importants. Une alternative est l’utilisation de souris transgéniques exprimant un gène toxique pour leurs cellules hépatiques. Des hépatocytes primaires humains sont alors greffés à ces souris également immunodéprimées. L’avantage est de pouvoir ainsi étudier de façon plus pertinente la biologie du VHB chronique. Néanmoins la réponse immunitaire adaptative ne peut donc pas être étudiée dans ces modèles. Enfin, il existe des souris doublement transgéniques, auxquelles sont greffées des hépatocytes et des cellules myéloïdes et lymphoïdes humaines. Ces dernières nécessitent d’être davantage caractérisées mais permettent d’étudier une réponse immunitaire plus pertinente face à l’infection du VHB (Pour plus d’informations : (Allweiss et Dandri 2016; Lai et Chen 2021)).

II. Biologie du virus de l'hépatite B

1. Taxonomie

Le virus de l'hépatite B est un virus à ADN partiellement bicaténaire et possède une transcriptase inverse ce qui lui donne son appartenance au groupe VII de la classification de Baltimore. Ce virus fait partie de la famille des *Hepadnaviridae* qui contient des virus pouvant être retrouvés chez les mammifères (Orthohepadnavirus), dont le VHB, et chez les oiseaux (Avihepadnavirus), avec le DHBV par exemple (Hépatite B du canard). Ces virus conservés

ont un tropisme hépatocytaire et une spécificité d'hôte étroite. Il est estimé que l'ancêtre commun du VHB et du DHBV se situe approximativement il y a 30 000 ans. Par conséquent, il n'y a que 40% d'homologie de séquence entre le VHB et le DHBV. A l'inverse, les deux virus hors primates les plus proches sont le GSHV et le WHV, respectivement hépatites de l'écureuil et de la marmotte. De façon intéressante, malgré l'éloignement génétique entre les Orthohepadnavirus et les Avihepadnavirus, l'organisation génétique reste similaire (Schaefer 2007).

Le virus de l'hépatite B est également un virus extrêmement ancien, ses origines datant potentiellement du Crétacé lors de l'émergence des oiseaux il y a 65 millions d'années. Il est proposé que ce virus fût initialement un virus aviaire qui aurait fait un saut zoonotique vers les mammifères et notamment vers l'Homme il y a 22 000 à 47 000 ans. Une longue évolution a ainsi pu avoir lieu entre le virus et l'Homme. Plusieurs modèles sont proposés mais l'évolution du VHB est considérée comme étant le produit de transmissions inter-espèces et d'évolution au sein de ses réservoirs. Par conséquent on peut remarquer une proximité importante entre les VHB des primates et de l'Homme, témoin d'une transmission récente ou régulière entre ces espèces. Le génotype J est notamment proposé comme étant le résultat d'une recombinaison entre le génotype humain C et l'hépatite B du gibbon. L'étude de l'évolution du VHB est un champ qui dépasse la virologie de par son ancienneté, allant jusqu'à être un témoin des flux migratoires préhistoriques (Littlejohn, Locarnini, et Yuen 2016).

2. Génotypes

Le virus de l'hépatite B est caractérisé par une hétérogénéité génétique importante du fait du taux d'erreurs attribuables à la transcriptase inverse durant la réplication. Ainsi il existe 10 génotypes (A à J) avec des différences notables entre eux. La répartition des génotypes est dépendante de la géographie (Figure 4) : les pays d'Afrique ou d'Europe de l'Est ont une transmission davantage horizontale dans l'enfance, avec une majorité de génotypes A, D et E. Le génotype A est prépondérant dans les pays d'Europe du nord, Amérique du nord et en Afrique subsaharienne. Les pays asiatiques où la transmission a plutôt lieu à la naissance de façon verticale présentent une majorité de génotypes B et C, qui sont également retrouvés en Australie. Le génotype D est principalement retrouvé dans le bassin méditerranéen, au Moyen-Orient et en Inde lorsque le génotype E plutôt en Afrique centrale et de l'ouest. Les génotypes F et G ont été retrouvés principalement en Amérique centrale et du sud tandis que le génotype

H est exclusivement représenté en Amérique centrale. Enfin les génotypes I et J ont été isolés au Vietnam, au Laos et au Japon (Velkov et al. 2018).

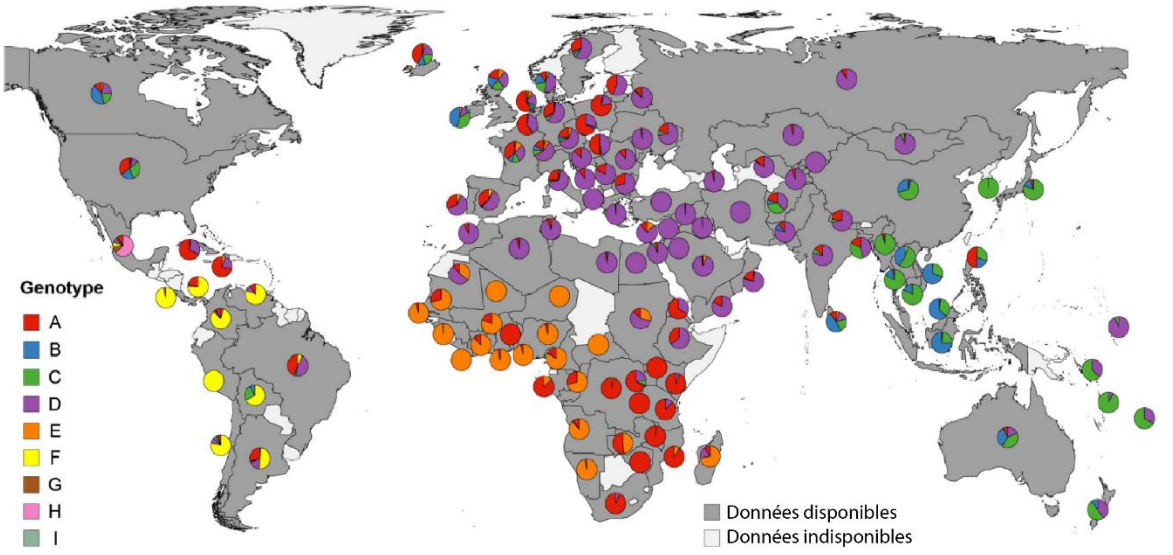


Figure 4 : Carte de la distribution des génotypes du VHB dans le monde. La répartition est représentée en graphiques circulaires dont les couleurs correspondent aux génotypes référencés (D'après (Velkov et al. 2018)).

Les génotypes influencent la pathogenèse : le passage à une cirrhose voire à un carcinome hépatocellulaire (CHH) a été montré comme étant plus important avec le génotype C qu'avec le B. L'établissement d'un carcinome ou d'une cirrhose est corrélé à des réplications virales élevées. De plus, la coïnfection, l'âge, la durée de l'infection, l'origine ethnique, la consommation d'alcool ou de tabac et le fait d'être un homme augmentent également cette probabilité. Ainsi le VHB est considéré comme étant responsable de 60% des cancers du foie dans les pays en voie de développement, jusqu'à 90% en Chine. En effet l'Asie étant une région fortement touchée par le génotype C, celui-ci favorisant le développement d'un CHH, elle est également une des régions les plus prévalentes en terme de cancer du foie. De la même manière, le génotype A, présent en Europe de l'Ouest et en Amérique du Nord, favorise davantage le CHH que le génotype D, également présent dans ces régions. Les CHH étant difficilement curables, le taux de survie à la suite de cet évènement reste relativement faible, et ainsi celui-ci reste une préoccupation de santé publique importante. Toutefois, il reste difficile d'évaluer l'impact de l'hépatite B étant donné qu'il faut pouvoir en déterminer la causalité dans la survenue d'un CHC ou d'une cirrhose (MacLachlan et Cowie 2015).

3. Structure des particules virales

3.1.Le virion

La première observation du virus de l'hépatite B en 1970 par le Professeur Dane et ses collaborateurs permis de décrire deux particules. A partir de sérum de patients infectés, ils ont pu révéler la présence de particules sous-virales vides (SVP), et de particules complètes alors appelées particules de Dane (Figure 5, A) (Dane, Cameron, et Briggs 1970).

Les particules de Dane mesurent 42 nm et sont classiquement observées dans le sérum à des concentrations d'environ 10^9 particules / mL, moins importantes que les SVP. Elles contiennent tous les éléments nécessaires à l'infection et à la réplication du virus. Ainsi la capside icosaédrique est constituée de 240 unités de protéine core abritant le complexe formé par la polymérase et l'ADNrc (relâché circulaire) partiellement double brin de 3,2kb. La capside et le complexe polymerase-ADNrc qu'elle contient constituent ensemble la nucléocapside. Celle-ci est enveloppée d'une bicouche lipidique dans laquelle sont enchâssées les protéines d'enveloppe S (small), M (medium) et L (large) (Jianming Hu et Liu 2017). Ces dernières sont en quantité inégales dans l'enveloppe ; la S à 65%, la M à 10% et la L à 25% (Figure 5, B).

3.2.Les particules sous-virales (SVP)

Les SVPs sont classiquement observées en large excès et sont dépourvues de capside et de génome. Produites dans l'ordre de 10^{14} particules/mL, elles sont non infectieuses et ont une morphologie en sphères et en filaments. Bien que les deux morphologies soient composées de protéines d'enveloppe, les sphères sont formées par 90% de protéines S et 10% de protéines M tandis que les filaments sont composés de 80% de protéines S, 10% de protéines M et 10% de protéines L (Figure 5). Elles sont synthétisées tout d'abord en filaments au sein du réticulum endoplasmique qui vont se scinder en sphères dans l'ERGIC, en trafiquant vers le Golgi avant d'être sécrétées (Patient, Hourioux, et Roingeard 2009). Ces particules sous-virales pourraient agir comme des leurres pour les anticorps neutralisants, fatiguant le système immunitaire et camouflant les virions infectieux.

3.3.Particules vides

Le second type de particules est composé de particules dénuées de génome viral (10^{11} particules/mL). Leur rôle reste incompris mais leur origine pourrait s'expliquer par deux

hypothèses : la formation de particules « aberrantes » ou « anormales », ou l'encapsidation de DNAse. L'équipe de Jianming Hu a ainsi montré que la sécrétion de particules vides était possible dans des conditions où les particules infectieuses n'étaient pas sécrétées. Les mutations de certains résidus de l'enveloppe interagissant avec la protéine core n'altèrent pas la sécrétion de particules vides lorsqu'elles empêchent la sécrétion de particules pleines (Ning et al. 2018). D'une autre manière, l'équipe de Jean-Pierre Vartanian a montré qu'en condition d'hypoxie, se rapprochant des conditions naturelles de production du virus, les particules virales encapsident la DNAse I (Hallez et al. 2019).

3.4.Particules contenant de l'ARNpg

Le troisième type de particules correspond à des particules contenant de l'ARN. Celles-ci sont retrouvées en quantité moins importante que les virions ADN, soit à une concentration de 10^6 particules/mL (J. Wang et al. 2016). Ceci suggère que l'enveloppement des nucléocapsides serait parfois peu spécifique des capsides contenant de l'ADNrc, à l'image du mutant de la core F97L qui conduit également à la sécrétion de nucléocapsides immatures, contenant de l'ADN simple brin (Yuan et al. 1999). Toutefois, il serait intéressant d'étudier l'infectiosité de ces particules. Les effets et le mécanisme de sécrétion de ces particules n'étant toujours pas clair, l'une des hypothèses serait que le traitement par des antirétroviraux bloquerait l'étape de transcription inverse. Il est également possible que la conformation de la core soit incorrecte, conduisant à l'exposition des signaux d'enveloppement quand bien même l'ARNpg n'est pas rétro-transcrit.

3.5.Capsides nues

Enfin des capsides nues sont également sécrétées. Il a par exemple été observé que la transfection de cellules HuH-7 par un plasmide exprimant la protéine de capside seule conduisait à la sécrétion de capsides nues dans le surnageant. Cette sécrétion est médiée par la protéine Alix, dont la colocalisation en intracellulaire avec la core dépend de son domaine BroI. Ce domaine lui permet de se lier aux membranes plasmiques afin d'induire une courbure propice au bourgeonnement des capsides nues. Ces capsides peuvent être vides ou remplies, néanmoins leurs rôles restent à être élucidé (Ning et al. 2011; Luckenbaugh et al. 2015; Wittkop et al. 2010; Bardens et al. 2011; T. Watanabe et al. 2007).

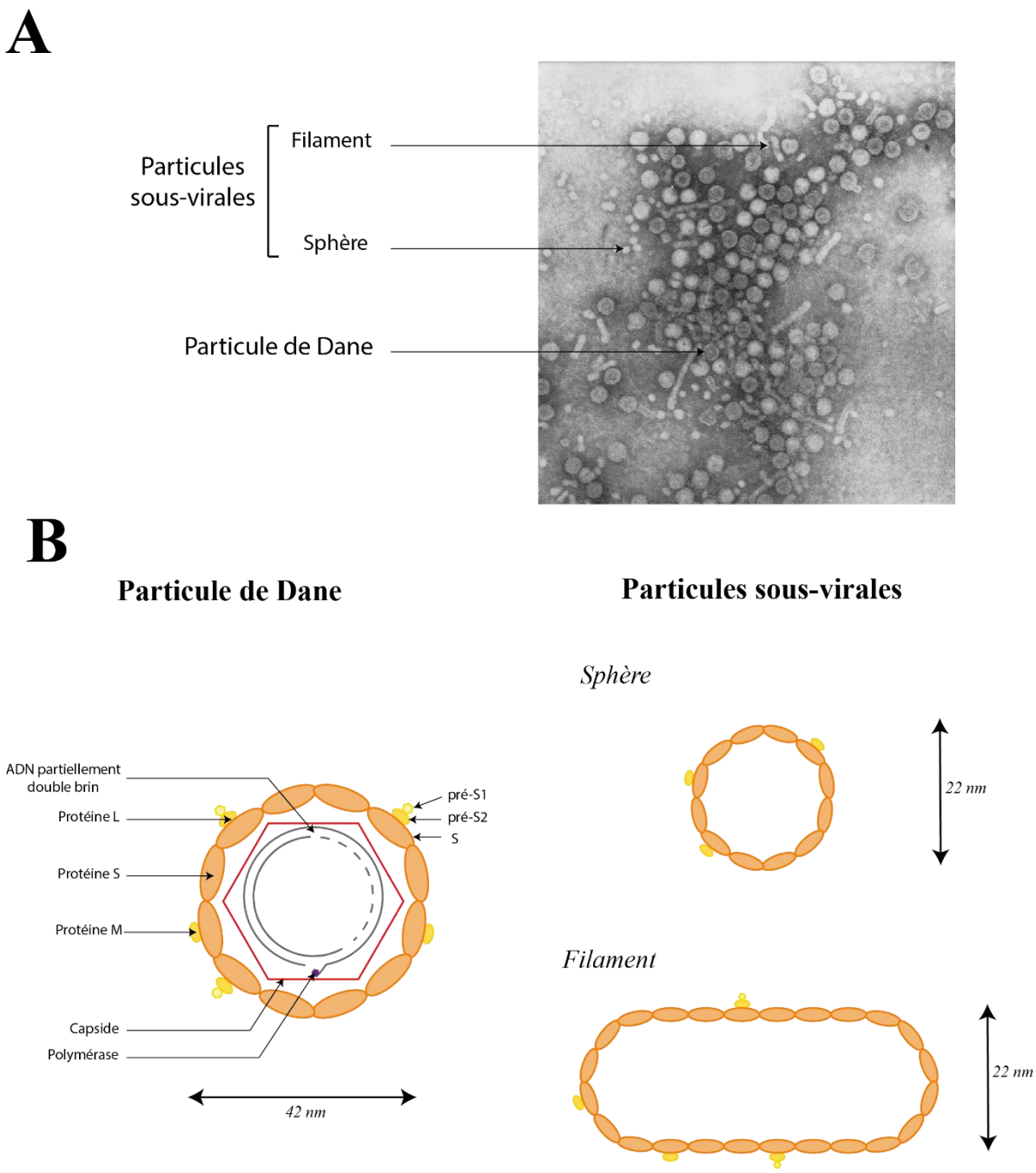


Figure 5 : Structure des particules de Dane et des particules sous-virales observées à partir de *sera* de patients infectés. A) Particules observées par microscopie électronique (image extraite de (Stannard et al. 1973)). B) Schéma des particules de Dane et des particules sous-virales.

4. Structure des composants viraux

4.1.L'ADN viral

Le génome d'HBV est composé d'un ADNrc (relâché circulaire) de 3,2kb partiellement double brin et circulaire. Celui-ci fait partie des plus petits génomes viraux connus, et ce grâce à la compaction de son génome en cadres de lecture chevauchants. Les 2/3 des acides nucléiques codent pour plus d'une protéine. Le brin négatif du génome qui sert de matrice pour la

transcription des ARN viraux est lié de façon covalente à la polymérase par son extrémité 5' dans le virion. Le brin positif, complémentaire, est quant à lui incomplet et de longueur variable. Le chevauchement du brin (+) avec les régions 5' et 3' du brin (-) sur environ 200pb assure la circularisation du génome. Ces 200pb sont délimitées par deux régions directement répétées appelées DR1 et DR2, qui ont un rôle essentiel lors des étapes de réplication (Jianming Hu et Seeger 2015). Enfin le génome du VHB contient deux régions régulatrices de types « enhancer » dénommées « Enh 1 » et « Enh 2 » (Figure 6).

Lors de l'entrée de l'ADNrc dans le noyau de la cellule hôte, celui-ci est complété en un ADN circulaire clos superenroulé (ADNccc). La transcription est alors assurée par la machinerie cellulaire via la polymerase II à partir de quatre promoteurs jusqu'au site de polyadénylation. L'épisome (ADNccc) sera alors transcrit en 5 ARN viraux (Beck et Nassal 2007). L'ADNccc est également constitué de 4 cadres de lecture chevauchants, ou ORF (Figure 6) :

-L'ORF C et P sont situés sur le même ARNm : l'ARN pré-génomique de 3,5kb, également matrice de la transcription inverse. L'ORF P code ainsi pour la polymérase tandis que l'ORF C code pour la protéine core, aussi appelée HBc, via son codon d'initiation. La protéine pré-core (AgHBe) sera traduite à partir de l'ARN messager pré-core légèrement plus long que le précédent, à partir de son propre codon d'initiation en amont de celui de la core, sur le même cadre de lecture.

-L'ORF S/PréS1/PréS2 est sous la dépendance de deux promoteurs « PréS1 et PréS2 », représentés par deux ARNm distincts, et trois protéines : l'ARNm PréS2/S de 2,4kb code pour la protéine de surface S (partie S) et M (partie PréS2 et S) et l'ARNm PréS1 de 2,1kb code pour la protéine de surface L (partie PréS1/PréS2/S).

-Enfin l'ORF X code pour la protéine X traduite à partir de son propre ARNm de 0,9kb.

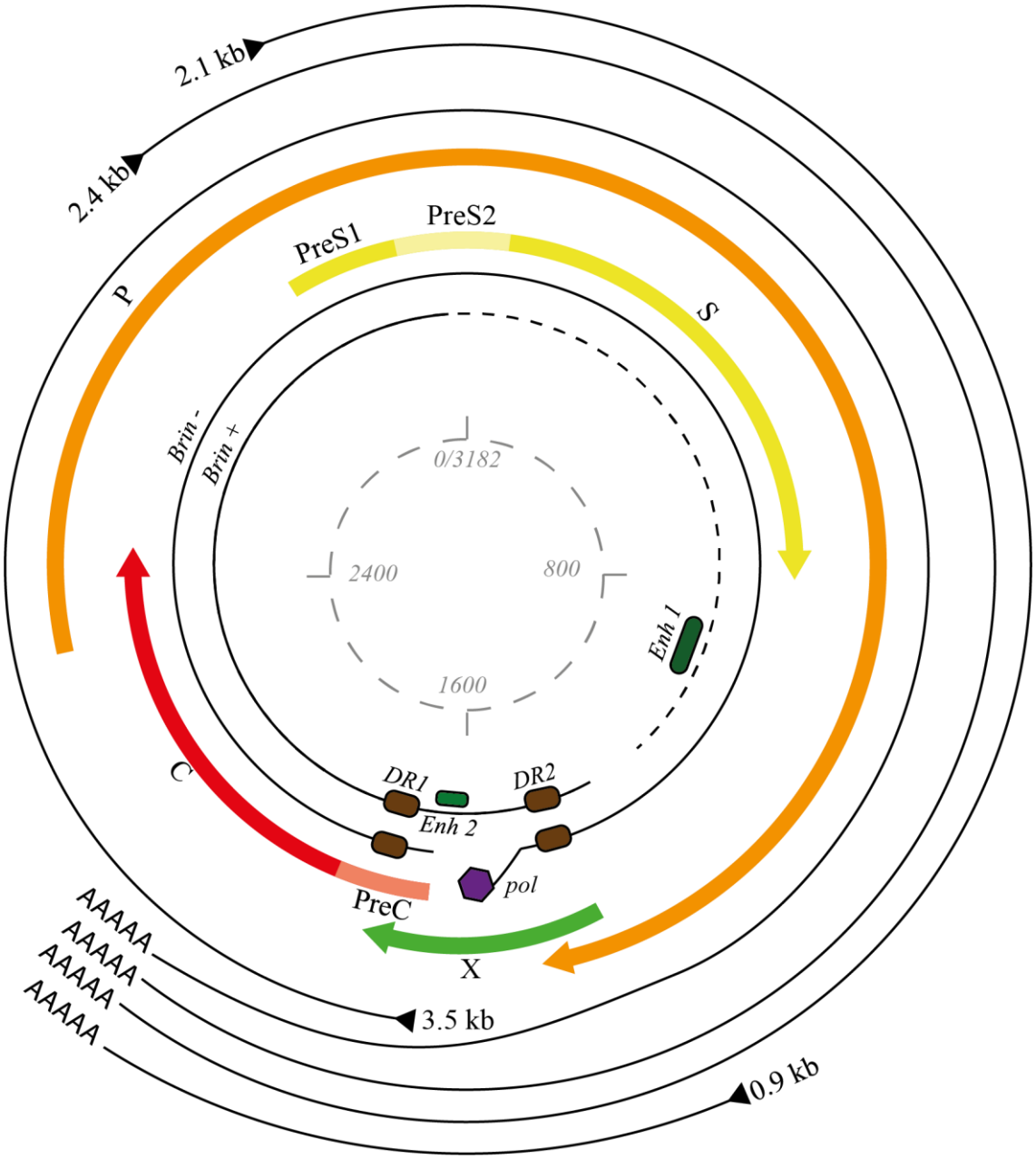


Figure 6 : Représentation de l'organisation du génome du virus de l'hépatite B. Le génome de l'hépatite B, ici représenté sous forme ADN relâché circulaire, est partiellement double brin et composé de deux régions directement répétées « DR1 » et « DR2 », de deux zones d'activation de la transcription « Enh 1 » et « Enh 2 » et est relié à la polymérase via l'extrémité 3' de son brin (-). Composé de 4 ORF C, P, C/PreC, X, PreS1/PreS2/S il code pour 4 ARNm (inspiré de (Beck et Nassal 2007)).

4.2.L'ARNpg

L'ARN pré-génomique sera rétro-transcrit une fois encapsidé. Cet ARNpg est composé de plusieurs domaines (Figure 7) :

-Le domaine situé entre la coiffe et la tige-boucle ε. Ce domaine situé en 5' de la boucle ε est long de 30 nucléotides. Cette distance semble être un élément crucial pour l'arrêt de la traduction (Ryu, Ahn, et Ryu 2010) et l'encapsidation de l'ARNpg (Jeong, Yoon, et Ryu 2000). Cette distance pourrait permettre à la polymérase d'intéragir avec la protéine eIF4E de coiffe qui pourrait avoir un rôle dans la synthèse de l'ADN (Kim, Wang, et Ryu 2010).

- La tige-boucle appelée ε est située en 5', au niveau de la région pré-core/core. Elle est constituée de deux structures en tiges, une basse et une haute, reliées par un renflement nécessaire à l'interaction avec la polymérase. La partie apicale est constituée d'une boucle reliant les deux côtés de la tige haute. Cette tige-boucle est essentielle pour l'encapsidation spécifique de l'ARNpg. Il a été montré que son insertion dans un ARNm était suffisante pour l'encapsidation d'ARN « étrangers » au virus (Junker-Niepmann, Bartenschlager, et Schaller 1990). Cette structure va interagit avec la polymerase, le complexe riboprotéique pouvant ainsi être encapsidé (Knaus et Nassal 1993; R Bartenschlager et Schaller 1992). Une structure similaire est présente en 3', en revanche cette dernière ne semble pas avoir de fonction et est présente dans tous les ARNm viraux.

-Les domaines PS (packaging signal). Récemment, Patel et al. proposent l'existence des signaux d'encapsidation aussi appelés PS (packaging signals). Leurs motifs conservés sont situés respectivement pour les signaux PS1, PS2 et PS3 : entre les résidus 3096-3102, 729-737 et 959-969. Ils sont structurés en tiges-boucles et contiennent un motif RGAG de reconnaissance des boucles riches en prolines. Initialement découverts par screening et méthode SELEX par l'équipe de Peter G. Stockley, ils ont été étudiés *in vitro* en utilisant des méthodes d'interactomique entre la protéine core et des fragments d'ARN (Patel et al. 2017).

-L'élément régulateur post-transcriptionnel (PRE). La zone contenant les PRE est composée de la région SLα (nucléotides 1292-1321) et SLβ (nucléotides 1411-1433) situées à la fin de l'ORF de la polymérase, et au début de l'ORF de la protéine X. Ces régions sont essentielles à l'export des ARNm hors du noyau. Bien que son rôle dans l'export soit absent pour l'ARNpg, la zone PRE semble importante pour sa stabilité et son épissage (Lim et Brown 2016).

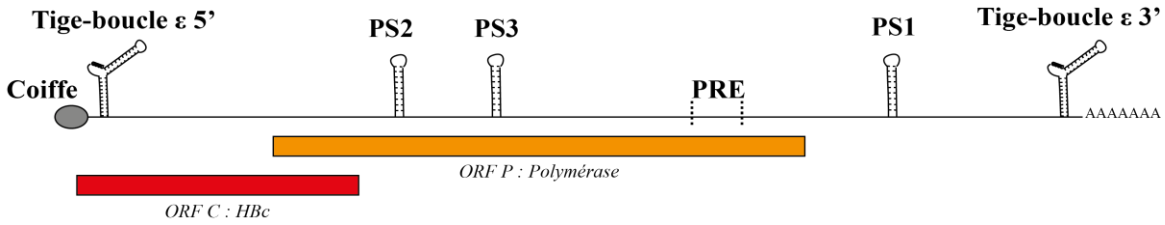


Figure 7 : Schéma de la structure de l'ARNpg. L'ARNpg est constitué d'une coiffe, de deux tiges-boucles en 5' et 3', d'un signal d'encapsidation PS1, PS2 et PS3 et d'une région PRE. Les ORF des protéines core et polymérase sont respectivement représentées en rouge et orange.

4.3. Les glycoprotéines d'enveloppe

Les protéines d'enveloppe sont transcrites à partir de l'ORF S, via 3 codons d'initiations distincts en phase. Les protéines S, M et L correspondantes ont en commun leur partie C-terminale de 226 acides aminés (aa) appelée « domaine S ». La protéine S est donc composée de ce « domaine S » uniquement. La protéine M possède une extension N-terminale de 55 aa nommée « pré-S2 » tandis que la protéine L possède les domaines S et pré-S2 auxquels s'ajoute un domaine N-terminal de 108 à 119 aa appelé « pré-S1 ». Ces protéines sont produites dans le réticulum endoplasmique (RE) et enchâssées via quatre domaines transmembranaires dans sa membrane. Les extrémités N et C-terminales sont initialement dirigées vers la lumière du RE, puis elles subissent des modifications post-traductionnelles de types N et O-glycosylations avant d'être fonctionnelles et d'envelopper la nucléocapside virale. Les trois protéines seront décrites dans les paragraphes suivants ainsi que dans la Figure 8 :

La protéine S codée par l'ORF S est constituée de 226 aa. Elle est suffisante pour la formation des SVPs. Elle est composée de quatre domaines transmembranaires en hélices α, TM I à IV, reliés entre eux par deux boucles cytosoliques (Cyt 1, Cyt 2) et une boucle antigénique AGL. La boucle AGL est située entre les domaines TM-II et TM-III, (résidus 124 et 146), contient le déterminant antigénique « a » et sa conformation est maintenue par un pont disulfure entre les Cystéines 121 et 149. Elle permet l'attachement des virions aux cellules par l'interaction de ses résidus basiques Arg-122 et Lys-141 aux HSPG (protéoglycanes à héparane sulfate). Enfin, la boucle AGL est la cible des anticorps neutralisants (Camille Sureau et Salisse 2013).

La protéine M, de 281 aa est également codée par l'ORF S. Elle est composée du domaine S et d'une extension N-terminale de 55 aa, le domaine pré-S2. Son rôle reste mal

connu car elle est présente chez les Orthohepadnavirus, mais absente chez les Avihepadnavirus. De plus, son absence ne semble pas affecter l'infectiosité des particules virales chez les patients (Santantonio et al. 1992). De la même manière, la morphogenèse du virus de l'hépatite D, qui nécessite la production de protéines d'enveloppe de l'hépatite B, n'est pas altérée par l'absence de protéines M (C Sureau, Guerra, et Lee 1994).

La protéine L est longue de 389 à 400 aa. Elle est composée du domaine S et pré-S2, et possède une extension supplémentaire de longueur variable, le pré-S1. La séquence 2-48 contient un domaine indispensable à la reconnaissance du récepteur hNTCP. Ce domaine contient le motif 9-NPLGF(F/L)P-15 reconnu par le Myrcludex B, peptide actuellement en essais cliniques en tant qu'inhibiteur d'entrée (Urban et al. 2014). Les aa 103 à 124 sont appelés « MD » (Matrix Domain) et permettent l'interaction de L avec le domaine « MBD » (Matrix Binding Domain) de la core. Enfin la région transmembranaire TM-I possède trois séries de résidus hydrophobes qui pourraient permettre la fusion membranaire après l'entrée virale et la libération de la capside de son enveloppe. Son extrémité N-terminale subit une modification post-traductionnelle avec l'ajout d'un acide myristique qui permet son ancrage dans la membrane (Bruss et Ganem 1991). Elle est retrouvée dans les particules sous-virales en bâtonnets et est également essentielle à l'infectiosité des particules virales.

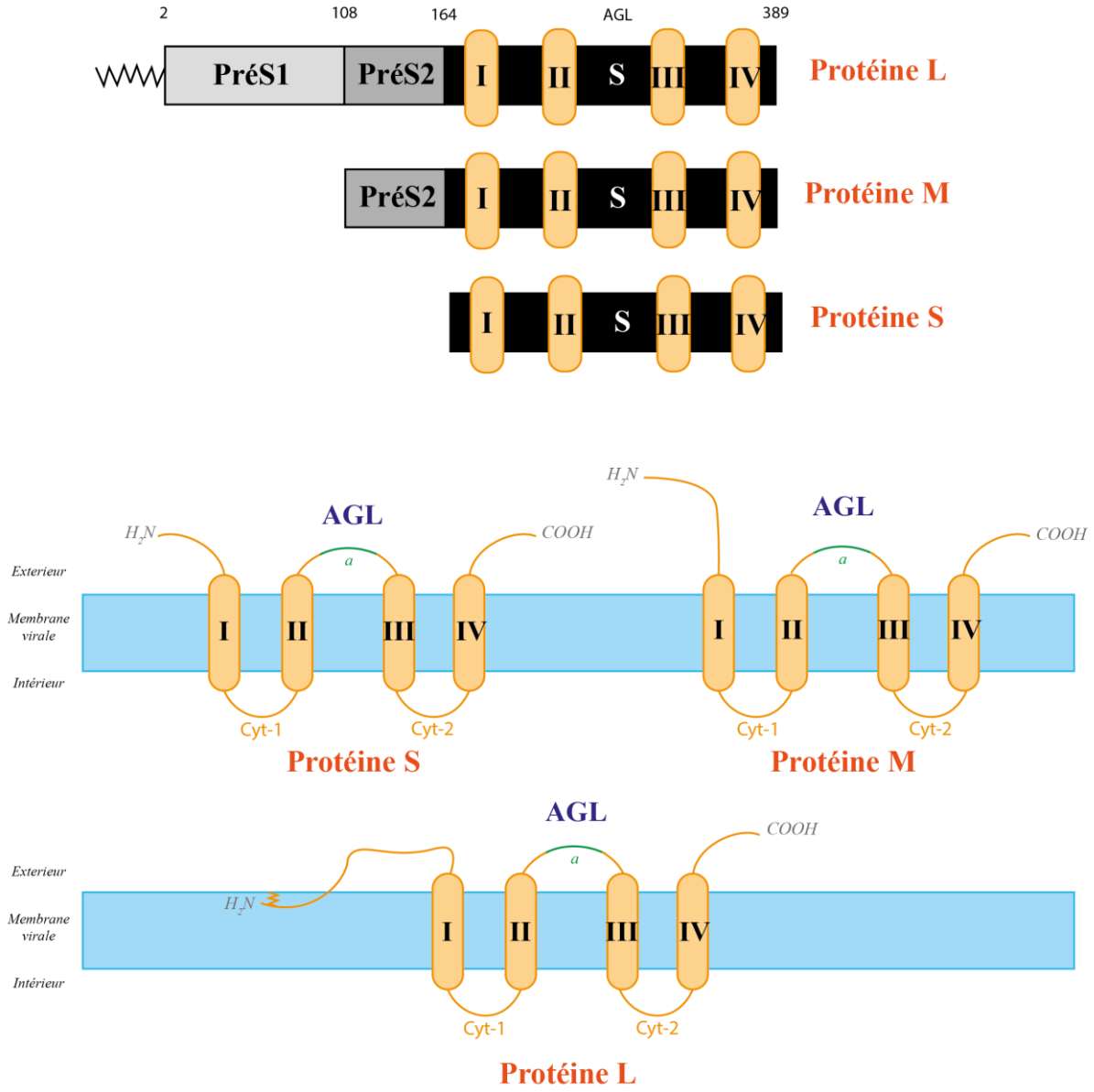


Figure 8 : Organisation des transcrits des protéines d'enveloppe et des protéines enchâssées dans la membrane virale. Les transcrits sont schématisés sur la partie haute avec les domaines transmembranaires indiqués (TM I-IV). La transcrit S est composée du domaine S, le transcrit M est composé du domaine S et PréS2 et le transcrit L est composé du domaine S, PréS2 et PréS1. Les protéines sont enchâssées dans la membrane virale avec les domaines Cyt-1 et Cyt-2 situés à l'intérieur de la particule et le domaine AGL contenant le déterminant antigénique « a » est situé à l'extérieur. Les parties N et C-terminales sont situées à l'extérieur pour les protéines S et M tandis que la partie N-terminale est enchâssée dans la membrane et la partie C-terminale est située à l'extérieur pour la protéine L (Adapté de (Urban et al. 2014)).

4.4.La protéine core : HBc

La protéine core, aussi appelée HBc, est une protéine multifonctionnelle de 21 kDa (Adam Zlotnick et al. 2015). Elle est codée par l'ORF C, ou Core/Pré-Core, et possède son propre codon d'initiation. Elle est composée de 183 aa, jusque 185 aa pour le génotype J, divisés

en trois domaines distincts : Le domaine N-terminal, le linker et le domaine C-terminal (Figure 9). Parmi ses rôles, elle est essentielle à la morphogenèse virale mais également au trafic intracellulaire de la nucléoprotéine, à la maintenance de l'ADNccc, à l'augmentation de la quantité d'ADNccc nucléaire, à l'encapsidation de la polymérase et de l'ARNpg, à la transcription inverse et à l'enveloppement. Elle permet également de moduler la réponse immunitaire en interagissant notamment avec les promoteurs de gènes stimulés par l'interféron.

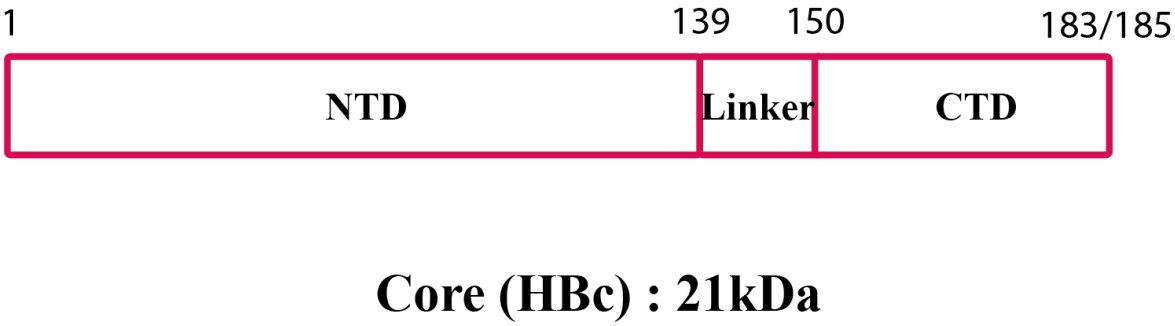


Figure 9 : Organisation de la protéine core, aussi appelée HBc, de 21kDa. Le domaine N-terminal (NTD) est constitué de 139 acides aminés, le domaine C-terminal (CTD) est constitué de 33 à 35 acides aminés et le linker de 10 acides aminés relie les deux parties entre elles.

4.4.1. Le domaine N-terminal

Le domaine N-terminal ou NTD est composé des résidus 1 à 139. Il est nécessaire et suffisant pour l'assemblage *in vitro,* de la protéine HBc en capside virale. En effet, lorsque la protéine est produite en bactérie *E. coli,* purifiée puis incubée à des concentrations élevées avec de fortes concentrations de sels, on observe la formation d'une capside possédant la même morphologie que les capsides purifiées dans un sérum de patient. Ces conditions *in vitro* ont permis de décrire les paramètres physicochimiques de la formation de la capside ainsi que sa structure 3D par Rayons X. Le monomère d'HBc est composé de 5 hélices α (α1 à α5) qui sont associées à la formation de structures tertiaires et quaternaires (Figure 10. A). L'hélice α 4 est divisée en deux parties α4a et α4b. Ce domaine forme un L composé d'un « châssis » correspondant à la partie basse de la protéine (α1, α2, α5), et d'une pointe (α3, α4) dont l'une des deux structures est coudée (α4a, α4b). L'épitope immunodominant c/e1 est situé à l'extrémité de cette pointe. Cet épitope est relativement flexible et permet l'insertion de rapporteurs fluorescents tels que l'eGFP, la mCherry ou d'autres tags comme le Flag ou le HA (Kratz, Bottcher, et Nassal 1999; J.-Y. Chen et al. 2018). La core contient une grande poche hydrophobe composée de résidus conservés qui vont permettre de stabiliser le dimère et de maintenir sa conformation. Cette poche sera décrite plus tard dans ce manuscrit (Partie III.3.1).

Ces résidus sont situés sur les hélices α1, la boucle connectant les hélices α1 et α2, l'hélice α4b et α5. C'est cette poche hydrophobe qui est notamment la cible de nouveaux antiviraux à action directe : les modulateurs allostériques de l'assemblage de core. Un exemple naturel de la modification de cette poche est la mutation F97L (Figure 10, B), observée chez certains patients, qui aboutit à la sécrétion de capsides immatures (Ceres, Stray, et Zlotnick 2004). Cette mutation réduit la taille de la chaine latérale en position 97 et réduit son pouvoir hydrophobe ce qui induit des changements significatifs dans la conformation de la protéine. Cette mutation ponctuelle provoque un changement conformationel de la protéine allant jusqu'à l'extrémité de la pointe, au niveau de l'epitope c/e1. Cette poche hydrophobe peut finalement, via la modulation de ses paramètres physico-chimiques, modifier les étapes d'assemblage, d'enveloppement, d'encapsidation, et de transport nucléaire de la capside.

La protéine core est capable de former des homodimères. L'hélice α3 est nécessaire à la formation d'homodimères d'HBc, bien que l'extrémité N-terminale de l'hélice α4 aie également, potentiellement, un rôle dans celle-ci (Figure 10, C) (Wynne, Crowther, et Leslie 1999). La structure caractéristique en L sous forme de monomère, devient un T inversé (⊥) en dimère, les hélices α3-α4 formant les spicules (Figure 10, B).

Un résidu possède un statut particulier dans l'oligomérisation : la cystéine 61 (Figure 10, B, C) qui est située dans l'hélice α4b. Ce groupement était initialement supposé comme étant responsable de l'interaction inter-monomère par l'établissement d'un pont disulfure. Les particules matures isolées de patients et de cultures cellulaires contiennent cette liaison (Jeng, Hu, et Chang 1991; Budkowska, Shih, et Gerin 1977). Cependant, des travaux plus récents montreraient que ce pont disulfure se formerait une fois les capsides formées (Selzer, Katen, et Zlotnick 2014).

A la suite de la formation de ces dimères, ceux-ci s'oligomérisent afin de former des hexamères puis des formes intermédiaires aboutissant à des capsides. Les acides aminés 113 à 143 contiennent des domaines clés pour l'interface inter-dimères (Wynne, Crowther, et Leslie 1999; Ponsel et Bruss 2003). Des travaux plus récents suggèrent également le rôle des aa 23 à 39 dans l'oligomérisation de la capside (Zheng et al. 2018). L'interaction entre les dimères aurait finalement lieu au niveau de l'hélice α5, d'une boucle riche en proline et du bras C-terminal d'un dimère (aa 113 à 143) qui interagiraient avec la boucle en amont de l'hélice α2 et cette même hélice provenant du dimère adjacent (aa 23 à 39). Ces régions contiennent notamment deux résidus déterminants : la tyrosine 132 et la phénylalanine 23 qui interagiraient entre eux (Figure 10, B, D) (Wynne, Crowther, et Leslie 1999; Alexander et al. 2013).

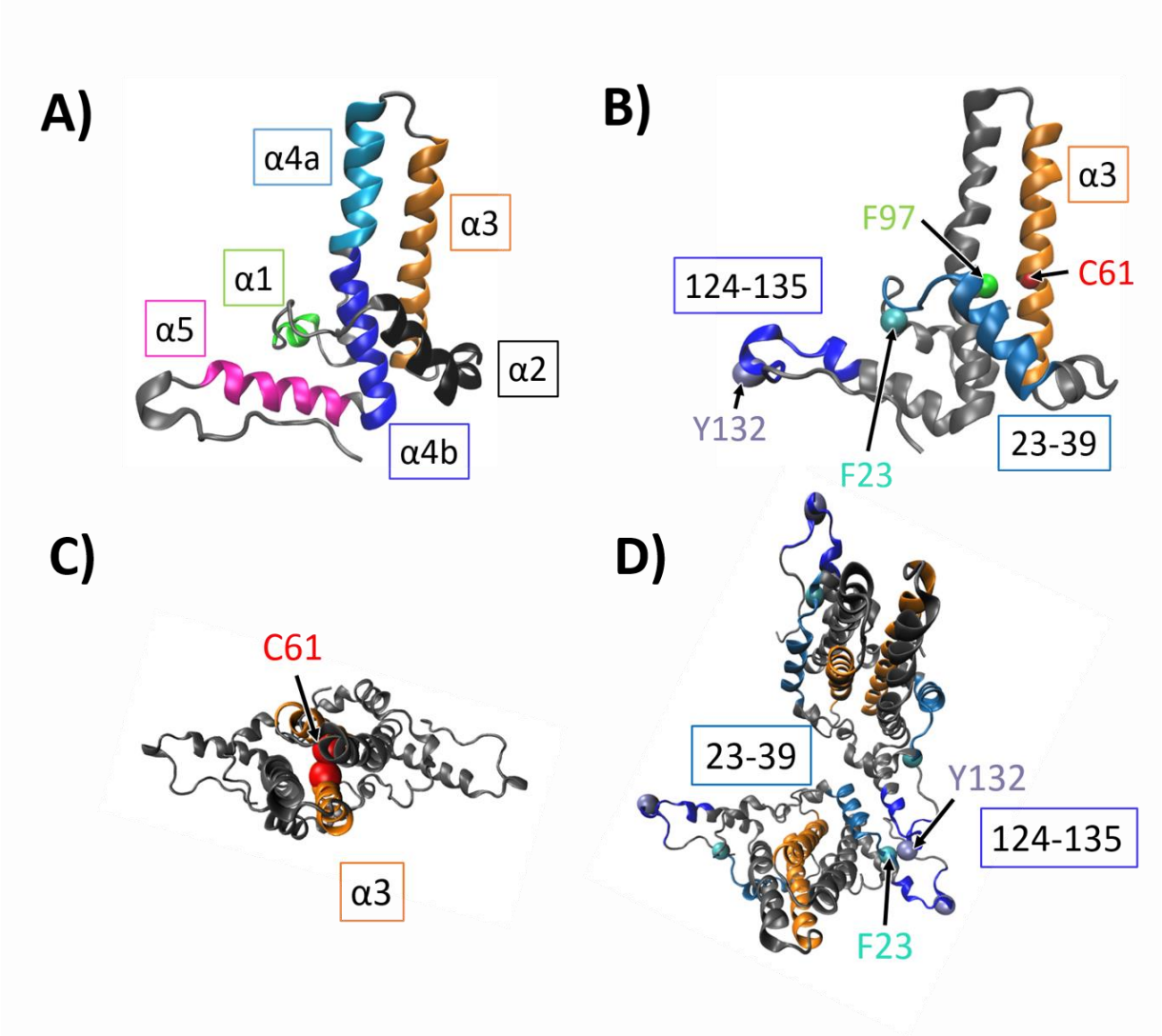


Figure 10 : Représentations tridimensionnelles des structures tertiaires et quaternaires de la protéine core. A) Core est constituée de 5 hélices α, 1 en vert, 2 en noir, 3 en orange, 4 en deux parties a en cyan et b en bleu, et 5 en magenta. B) L'hélice α3 (orange) est essentielle pour les interactions intra-dimères, tandis que les domaines 124-135 (bleu) et 23-39 (bleu clair) sont essentiels pour les interactions inter-dimères. Le résidu Y132 (violet) interagit avec le résidu F23 (cyan). Le résidu C61 (rouge) forme des ponts disulfures avec le dimère adjacent une fois la capside formée. Le résidu F97 (vert) peut être naturellement muté et provoque des phénotypes de sécrétion précoce. (Identifiant PDB : 1qgt) C) Résidu et domaine impliqué dans l'interaction entre les monomères : l'hélice α3 et le résidu C61. D) Résidus et domaines essentiels pour l'interaction entre les dimères : les domaines 124-135 et 23-39 et les résidus Y132 et F23.

Les dimères vont alors s'assembler entre eux afin de former des trimères de dimères, aussi appelés hexamères, plus stables : c'est la nucléation. Ces trimères de dimères sont alors composés de monomères de quatre conformations différentes appelées A, B, C et D. Les monomères sont associés en dimères A+B et C+D au cours de leur oligomérisation en hexamères puis en capsides. Les quatre conformations sont légèrement différentes : leur structure résolue en cristallographie montre un léger mouvement de chaque monomère afin de

s'adapter à la liaison avec les autres monomères et permettre la formation de la capside. Cette différence a particulièrement lieu au niveau de la région d'interaction entre les dimères (Wynne, Crowther, et Leslie 1999; Packianathan et al. 2010). L'état d'hexamère a un temps de vie court et l'assemblage continue à partir de ce noyau d'hexamère et conduit à la formation d'une capside icosaédrique de 240 monomères. Ces capsides sont de symétrie T=4 et font une taille d'environ 34nm (Figure 11). Par ailleurs, des capsides de symétrie T=3 peuvent être formées, constituées de 180 monomères, et ce de façon dépendante de l'environnement. Les virions sont néanmoins composés à 95% de forme T=4 qui contiennent des dimères de conformation A+B et C+D tandis que les capsides T=3 contiennent quant à eux des dimères A+B et C+C. L'infectiosité des virions de symétrie T=3 reste à être déterminée (Venkatakrishnan et Zlotnick 2016). La formation de ces capsides est extrêmement sensible à la cinétique, et un timing précis est nécessaire pour la formation de la capside. L'équipe d'Adam Zlotnick a ainsi montré qu'en jouant sur les conditions expérimentales (concentration, sel…), l'assemblage aboutissait à une accumulation d'intermédiaires variés, allant de 7 à 35 dimères, et à la formation rapide de capside T=4 et T=3 (Asor et al. 2020). L'observation de virions natifs, purifiés à partir de sérum de patients a montré la présence de capsides et de virions de symétrie T=4 et T=3, ce qui suggère que la cinétique d'assemblage *in vivo* peut être perturbée par l'environnement cellulaire (Dryden et al. 2006).

La capside est également poreuse. En fonction des monomères les constituant, trois types de pores y sont présents :

-Deux dimères C/D et deux monomères B forment un axe de symétrie 2 et s'organisent autour d'un pore de 12 à 15 Å. Ces pores sont plutôt hydrophobes de par la composition des acides aminés qui les constituent.

-Trois dimères C/D forment un axe de symétrie 3. L'axe de symétrie quasi-3 existe également, lorsqu'un dimère C/D et deux dimères A/B s'organisent autour du pore. Les pores ainsi formés mesurent environ 14Å. Ces pores sont constitués de résidus plutôt polaires.

-Cinq monomères A forment un axe de symétrie 5. Les pores ainsi formés sont correspondent à une ouverture de 2A et sont généralement associés aux CTD. (Wynne, Crowther, et Leslie 1999).

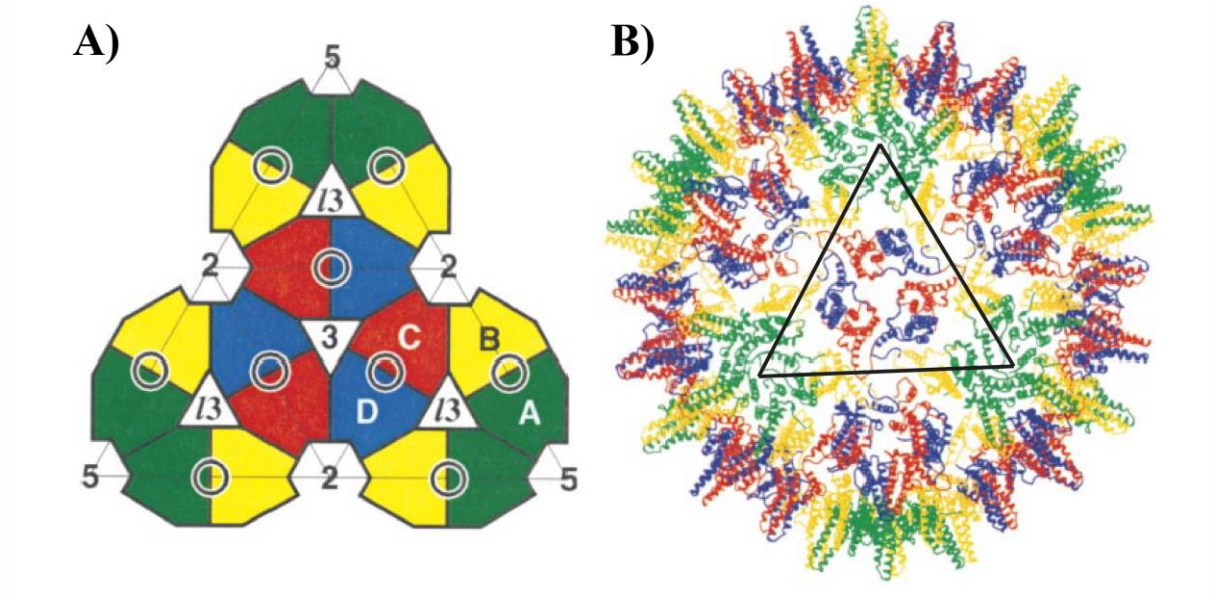


Figure 11 : Structure de la capside du VHB de symétrie T=3. A) La capside est constituée d'hexamères formant des axes de symétrie 2, 3, quasi-3 (l3) et 5. Chaque hexamère est constitué de deux dimères A/B et d'un dimère C/D. B) La capside formée a une structure icosahédrique de symétrie T=3 ou T=4. Le triangle reporté ici correspond au triangle de la partie A dont les extrémités sont constituées des axes de symétrie 5 (extrait de (Wynne, Crowther, et Leslie 1999)).

La core interagit avec la protéine L d'enveloppe. Les résidus de la core nécessaires pour l'interaction avec l'enveloppe sont regroupés sous le nom de « Matrix Binding Domain » ou MDB (Figure 12). Ces résidus sont localisés à la base du spicule (L60, L95 et K96) et à proximité des pores, dans le sillon entre deux protéines (S17, F18, F122, R127, N136, N137 et I139).

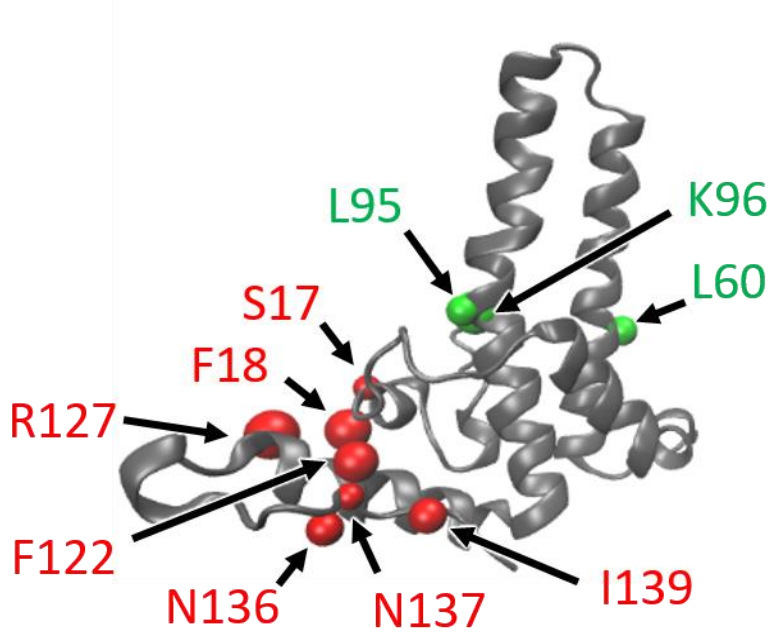


Figure 12 : Représentation tridimensionnelle des résidus de core impliqués dans l'enveloppement : le MBD. Des résidus à la base du spicule en vert et dans le sillon entre les dimères en rouge sont essentiels pour l'enveloppement de la nucléocapside.

4.4.2. Le linker ou espaceur

Le linker est situé entre le résidu 140 et 149 et sert de charnière entre le domaine N-terminal et le domaine C-terminal (CTD) car sa délétion ou sa substitution empêche l' assemblage correct des capsides en symétrie T=4 (Watts et al. 2002). Par ailleurs, les travaux récents de l'équipe de Jianming Hu suggèrent que le linker puisse aussi avoir un rôle dans l'encapsidation de l'ARN pré-génomique, dans la synthèse de l'ADNrc, dans la sécrétion ainsi que dans la phosphorylation (en lysats de réticulocytes de lapin) (K. Liu et al. 2018).

4.4.3. Le domaine C-terminal

Enfin le domaine C-terminal (CTD) est situé entre les résidus 150 et 183/185. Le CTD est dispensable *in vitro* pour l'assemblage de la capside. Néanmoins il s'est montré nécessaire dans des études réalisées avec des capsides produites en lysat de réticulocytes de lapin (RRL) et en germes de blé (Ludgate et al. 2016; S. Wang et al. 2019). Il possède également un rôle dans l'encapsidation de l'ARNpg en interagissant avec la polymérase (Lott et al. 2000).

La séquence primaire du CTD est caractérisée par la présence de 16 arginines regroupées dans 4 domaines dits riches en arginines (ARD, Figure 13, rouge)), 7 sérines et une thréonine (Figure 13, vert). Ces acides aminés lui donnent des propriétés électrostatiques assez particulières : les arginines chargées positivement et sept des résidus sérine/thréonine peuvent être phosphorylés et donc chargés négativement. La phosphorylation apporte deux charges négatives ce qui porte le nombre de charges négatives à 14, contre 16 charges positives apportées par les arginines. La charge de la protéine core est ainsi modulée par la phosphorylation et la déphosphorylation du CTD. Néanmoins la quantification du nombre de phosphorylations est difficile étant donné la nature dynamique de cet évènement, dépendante du cycle viral mais également cellulaire. Plusieurs kinases candidates ont été identifiées : la kinase A, la polo-kinase 1 (PLK1), la CDK2, la kinase C alpha (PKCα) et les SRPK, notamment la SRPK1(Diab et al. 2017; Daub et al. 2002; Wittkop et al. 2010; Ludgate et al. 2012). Il a récemment été montré que la phosphatase 1 serait capable de déphosphoryler la protéine core et serait encapsidée avec les ARNpg au sein des nucléocapsides (Z. Hu et al. 2020, 1).

Ce phénomène dynamique est important pour plusieurs étapes : l'encapsidation, la transcription inverse et la maturation de la capside mais également pour l'import nucléaire. Il est important de noter que l'encapsidation spécifique de l'ARNpg nécessite un équilibre des charges (Venkatakrishnan et Zlotnick 2016). En effet, la production de capsides non phosphorylées, par exemple chez E coli, conduit à l'obtention de capsides pleine d'ARN bactérien (Porterfield et al. 2010; M Nassal 1992; Heger-Stevic et al. 2018). Au contraire, les capsides non réplicatives produites en cellules de mammifères seraient phosphorylées et vides d'ARN cellulaire et viraux (Ning et al. 2011; Heger-Stevic et al. 2018; Su et al. 2016). Une étude a quantifié la phosphorylation de ces capsides vides produites en cellules de mammifère par l'utilisation de phosphate radioactif et montrent que la phosphorylation des capsides vides en cellules humaines ne serait que partielle. De plus, lorsque des mutants de la protéine core mimant l'hyper ou l'hypo-phosphorylation sont utilisés, l'ARNpg n'est plus que faiblement encapsidé (Jung et al. 2014). Par conséquent l'équilibre des charges permet à la protéine core d'encapsider de façon spécifique l'ARNpg et permettrait également l'interaction avec les signaux d'encapsidation de l'ARNpg (Patel et al. 2017). De manière intéressante, la phosphorylation de résidus localisés dans la région N-terminale (S44 et S49), situés dans le châssis vers la face intérieure de la capside, conduit également à l'inhibition de l'encapsidation de l'ARNpg (J. Luo et al. 2020).

La déphosphorylation de ce domaine aurait lieu pendant les étapes de transcription inverse de l'ARNpg. En effet, tandis que les capsides immatures (contenant de l'ARNpg) sont partiellement phosphorylées, des capsides matures (contenant de l'ADN) ont été observées déphosphorylées (Perlman et al. 2005; Q. Zhao et al. 2018; Basagoudanavar, Perlman, et Hu 2007). D'autres auteurs observent néanmoins des capsides matures phosphorylées, ce qui pourraient permettre leur interaction avec les importines (Machida et al. 1991).

Par ailleurs, ce domaine C-terminal serait responsable de l'activité chaperonne des acides nucléiques d'HBc. Cette activité consiste à faciliter les réarrangements structuraux des acides nucléiques nécessaires à la transcription inverse de l'ARNpg en ADNrc (Chu et al. 2014; Su et al. 2016). De manière intéressante, cette activité est elle aussi modulée par le mécanisme de phosphorylation/déphospho. Ainsi, les travaux de Chu et al ont proposé que la déphosphorylation progressive provoquait une augmentation de l'activité de chaperonne ce qui en retour facilitait la transcription de l'ARN en ADN (Chu et al. 2014).

Ce domaine CTD contient des signaux d'import (NLS) et d'export (NES) nucléaires qui permettraient la diffusion de la protéine core dans la cellule. La localisation précise du NLS sur le CTD reste imprécise. L'équipe de Kann suggère que les régions 158-168 et 165-175 sont importantes pour l'import nucléaire de la capside alors que d'autres résultats montreraient que le NLS serait dans les région 145-156 et 172-183 (Figure 13) (Kann et al. 1999; Eckhardt, Milich, et McLachlan 1991). Enfin, une troisième étude propose un NLS dans la région 163-179 (Yeh, Liaw, et Ou 1990). Ces différentes études utilisent des méthodes différentes : L'équipe de Kann utilise des peptides du CTD incubés avec un mélange de cellules HuH-7, d'ATP et de RRL. Les autres travaux utilisent des mutants de délétion, incubés en fibroblastes de souris (Eckhardt, Milich, et McLachlan 1991) ou en cellules COS (Yeh, Liaw, et Ou 1990). Finalement, toutes ces études s'accordent sur la présence d'au moins un NLS sur le CTD de la core.

Le signal d'export nucléaire, ou signal de rétention cytoplasmique (CRS) a été étudié par Li et al. par mutation des ARD en alanine. Ils ont ainsi suggéré par immunofluorescence et western blot à partir de cellules HuH-7 que ce signal serait localisé autour des ARD II et IV. L'export nucléaire serait dépendant de la protéine TAP (H.-C. Li et al. 2010). En conclusion, il a été suggéré que les NLS se situeraient au niveau des ARD I et III du CTD afin de permettre son import nucléaire par Li et al. L'export des protéines core aurait lieu via les ARD II et (Figure 13)(H.-C. Li et al. 2010).

Ce domaine n'est pas conformé et balaierait donc l'espace conformationel. En parallèle, la capside est une structure flexible, et possède des pores par lesquels le CTD peut sortir. Par conséquent, celui-ci est, en fonction des étapes du cycle viral, plus ou moins exposé à l'extérieur de la capside. Il serait localisé partiellement à l'extérieur de la capside vide et à l'intérieur des capsides contenant de l'ARN, piégé par les interactions électrostatiques entre ses ARD et la charge négative de l'ARN. Le CTD serait alors partiellement exposé à l'extérieur de la capside contenant de l'ADN en réaction à la répulsion électrostatique induite par l'augmentation de la charge négative induite par le passage à l'ADN. Sa localisation hors de la capside permettrait ainsi aux signaux NLS d'interagir avec les importines. Une fois localisé à l'extérieur, ce CTD pourrait alors être déphosphorylé (Rabe et al. 2003; J. C.-Y. Wang, Dhason, et Zlotnick 2012; C. Chen, Wang, et Zlotnick 2011).

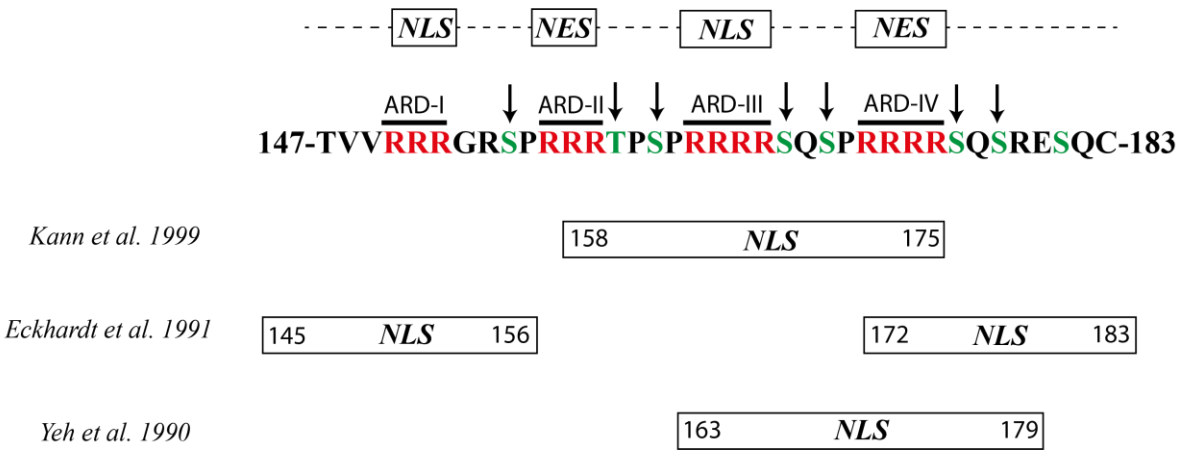


Figure 13 : Schéma récapitulatif des rôles du domaine C-terminal de la core et de la bibliographie associée. Le domaine C-terminal est composé de quatre ARD (I à IV) indiqués sur la séquence en rouge, 7 sérines et une thréonine (en vert) dont les résidus phosphorylés sont indiqués par une flèche. Les régions suggérées par la littérature comme étant des NLS sont indiquées sous la séquence. Les NLS et NES suggérés en tant que bilan de cette littérature par Li et al. 2010 sont indiqués au-dessus de la séquence (Adapté de Li et. al, 2010).

4.5.La protéine pré-core : HBe

La protéine pré-core HBe est une protéine de 25 kDa. Elle est codée par l'ORF C ou Core/PréCore et possède son propre codon d'initiation en amont de celui de la core. La séquence supplémentaire de 29 aa située en N-terminal permet, de par sa nature hydrophobe, un ancrage

dans la membrane du RE. La région N-terminale est alors clivée par une « signal peptidase » pour donner la protéine p22, de 22kDa, possédant seulement 10aa de plus que la protéine core. Un second clivage de la partie C-terminale par une protéase furine-like a alors lieu dans le Golgi, donnant naissance à l'AgHBe de 17kDa qui sera sécrétée (Figure 14) (Messageot et al. 2003).

Malgré la forte similarité de séquence avec la protéine core, la liaison entre la cystéine -7 et la cystéine 61 modifie la conformation et permet à l'HBeAg d'adopter une antigénicité qui lui est propre (Michael Nassal et Rieger 1993). Celle-ci peut alors se dimériser et être sécrétée. Bien que non essentielle à l'infection, cette protéine possède un rôle tolérogène du système immunitaire en modulant les systèmes inné et adaptatif (Walsh et Locarnini 2012). C'est également un indicateur de l'avancée de l'infection : l'établissement d'une réponse immunitaire dirigée contre l'antigène HBe (AgHBe) et la diminution du taux sérique d'AgHBe sont synonymes de la progression de la pathologie vers la phase de contrôle immunitaire de l'infection ou à la guérison. Cette diminution ne prévient toutefois pas les potentielles réactivations virales. Enfin, il faut souligner que si la protéine initiale de 25kDa, est incorrectement maturée ou hydrolysée par les protéases cellulaires, cela aboutit à un marqueur appelé p22cr, qui peut s'assembler avec la protéine core afin de donner des capsides (Kimura et al. 2005; T. Inoue et Tanaka 2019). Ce marqueur fait parti, avec la protéine HBe et HBc des antigènes reliés à la protéine core ou HBcrAg qui seront décrits plus tard.

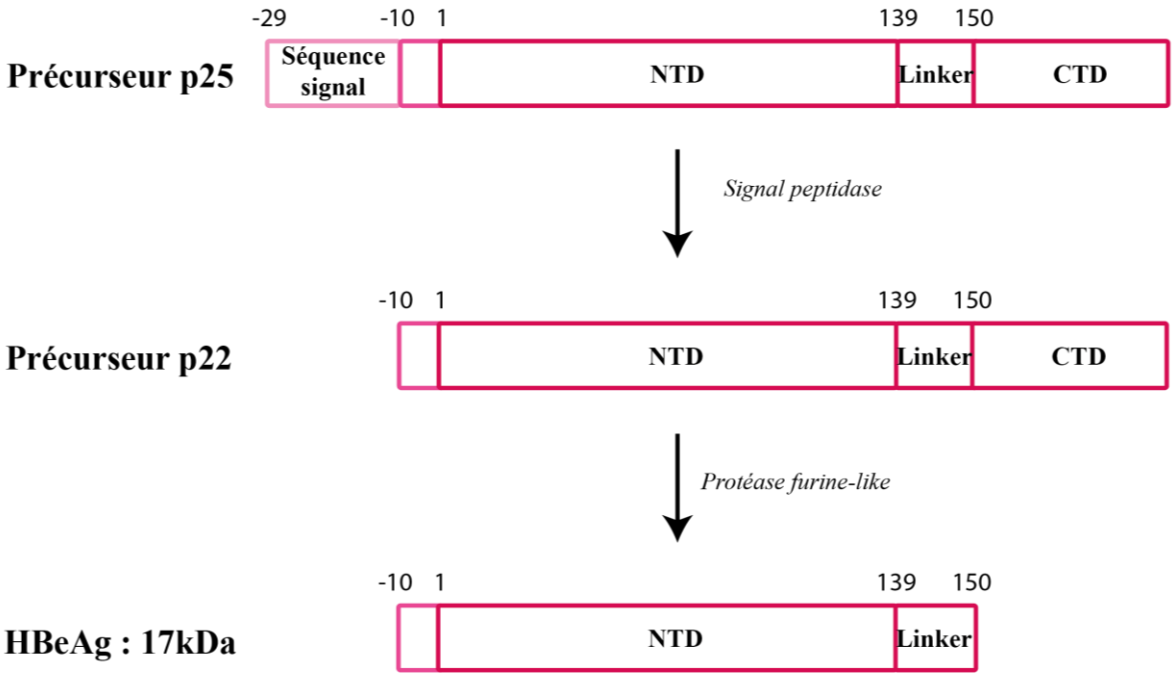


Figure 14 : Processus de synthèse de l'antigène HBe. L'antigène HBe est traduit à partir du même cadre de lecture que la core, ainsi les domaines NTD, le Linker et le CTD sont représentés. Le précurseur p25 est synthétisé avant d'être clivé par une protéase « signal peptidase » puis par une protéase furine-like afin de supprimer la séquence -29 à -10 et le domaine C-terminal de la core. Le produit, l'HBeAg, est d'un poids de 17kDa.

4.6.La polymérase : pol

La polymérase (pol) est une protéine de 90kDa codée par l'ORF P et traduite à partir de l'ARN pré-génomique. Elle est associée à plusieurs fonctions : transcription inverse et ribonucléase H. Elle est également impliquée dans l'encapsidation de l'ARN pré-génomique. Pol est composée de trois domaines : le domaine TP, un spacer, le domaine RT, et le domaine RNase H (Figure 15).

Le domaine TP ou « terminal protein » est un domaine observé uniquement chez les Hepadnavirus. Situé de l'aa 1 à 178, il est composé d'un motif important dans sa région C-terminale nommé « motif T3 » (aa 153-160), qui va pouvoir interagir avec un second motif nommé RT1 situé dans le domaine RT (aa 357-381). Cette interaction intramoléculaire permet à la polymérase d'adopter la conformation nécessaire à son interaction avec l'ε de l'ARN pré-génomique. Ce complexe est un pré-requis à l'initiation de la transcription inverse puisque l'hydroxyle de la tyrosine 63 de la polymérase est l'amorce réplicative qui établit une liaison covalente avec le premier résidu de l'ADN(-). Le résidu R105 serait également essentiel pour

l'encapsidation et la transcription inverse de l'ARN pré-génonomique (Shin, Park, et Ryu 2011). Les auteurs suggèrent que ce résidu pourrait intéragir avec l'ARNpg après l'activité chaperonne de la protéine core.

Le « spacer » ou espaceur correspond aux aa 178 à 336 et relie le domaine TP au domaine RT. Trois cystéines situées sur les positions 313, 324 et 328 participeraient à l'interaction de la polymérase avec la protéine core (Kim, Lee, et Ryu 2009).

Le domaine RT ou « Reverse transcriptase » est localisé entre les aa 336 et 680 et a pour rôle les activités d'ADN polymérase ARN dépendante et ADN dépendante. Ces activités permettront la transcription inverse de l'ARN pré-génomique en l'ADN(-) et la copie de ce brin (-) en brin d'ADN(+). Le domaine RT contient un motif conservé « YMDD » (tyrosine-methionine-aspartate-aspartate) qui forme un site actif commun à plusieurs polymérases de rétrovirus et est par conséquent fondamental pour la synthèse d'ADN (Argos 1988; Scott A Jones et Hu 2013). Il contient également le motif RT1 précédemment discuté. Enfin le domaine RNase H (RH), situé entre l'aa 680 et 832, contient un motif « DEDD » (aspartate-glutamate-aspartate-aspartate) essentiel pour la dégradation de l'ARN en coordonnant l'interaction avec des ions métalliques (Pour plus d'informations (Nowotny et al. 2005)).

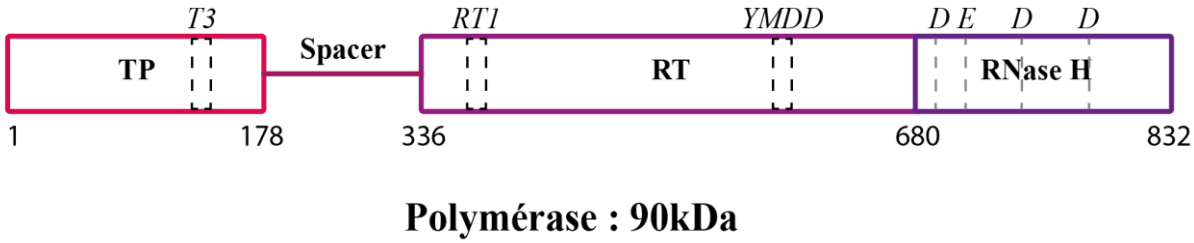


Figure 15 : Organisation de la polymérase du VHB. La polymérase est constituée de 4 régions : TP, spacer, RT et RNase H. Ces régions comportent des motifs essentiels pour la fonctionnalité de la polymérase : T3, RT1, YMDD et le motif DEDD.

4.7.La protéine X

La X est une protéine de 17,5kDa composée de 154 acides aminés. Cette protéine est essentielle à la réplication virale *in vivo* et à l'activation transcriptionnelle de l'ADNccc (F Zoulim, Saputelli, et Seeger 1994; Lucifora et al. 2011). Cette protéine a fait l'objet de nombreuses études pour son rôle dans l'oncogenèse viro-induite par le VHB. Elle est notamment capable de moduler l'expression de gènes par l'intermédiaire de son interaction

avec des facteurs de transcription (Twu et Schloemer 1987). Elle peut recruter le complexe CUL4/DDB1 et permettre l'ubiquitination et donc la dégradation par le protéasome de facteurs de restrictions comme SMC 5/6 (Song et al. 2021). Ce dernier mécanisme « tolérogène » s'active depuis les premières phases jusqu'à l'établissement d'un CHC et pendant celui-ci via des mutations adaptatives. En effet cette protéine possède des propriétés qui évoluent en fonction de son état de mutation mais aussi de la délétion de sa partie C-terminale. Ainsi, il a été montré que la forme tronquée de la X est associée à l'établissement de CHC, et que des mutations permettaient de maintenir ses activités, dont notamment la dégradation des facteurs de restrictions, et potentiellement d'adapter le virus à l'environnement d'une tumeur (Rivière et al. 2019). HBX possède également des rôles dans les mécanismes épigénétiques, via les microARN, les ARN non codants, l'acétylation et la méthylation. En plus de moduler l'expression et l'activité des gènes viraux et cellulaires, elle peut également intervenir sur les mécanismes liés à l'apoptose, à l'immunité, aux réparations de l'ADN (dont SMC 5/6), et au stress oxidatif (Geng 2015; Chong et al. 2020).

4.8.La protéine HBSP

L'épissage de l'ARN pré-génomique conduit notamment à un ARNm appelé « SP1 » de 2,2kb traduit en une protéine de 93 aa (Figure 16). La protéine ainsi obtenue est appelée HBSP (Hepatitis B Spliced Protein). Elle inclut les 138 premières bases de la polymérase suivies de 141 bases de la fin de la région de pol. La deuxième partie de la séquence d'HBSP suit un un second cadre de lecture et est donc composée d'aa différents de la fin de pol. Elle a été pour la première fois mise en évidence à partir de biopsies de foies infectés (Soussan et al. 2000). Ses rôles biologiques ne sont pas clairement définis, néanmoins il a été montré que son expression était associée à la fibrose, et donc à la cirrhose, ainsi qu'à la réplication virale (Soussan et al. 2003). De plus il a récemment été montré qu'elle était capable d'interagir avec différents facteurs afin de limiter l'inflammation hépatique, et d'inhiber l'apoptose, ce qui contribue à la persistance des hépatocytes infectés (S.-X. Wu et al. 2018; J. G. Pol et al. 2015).

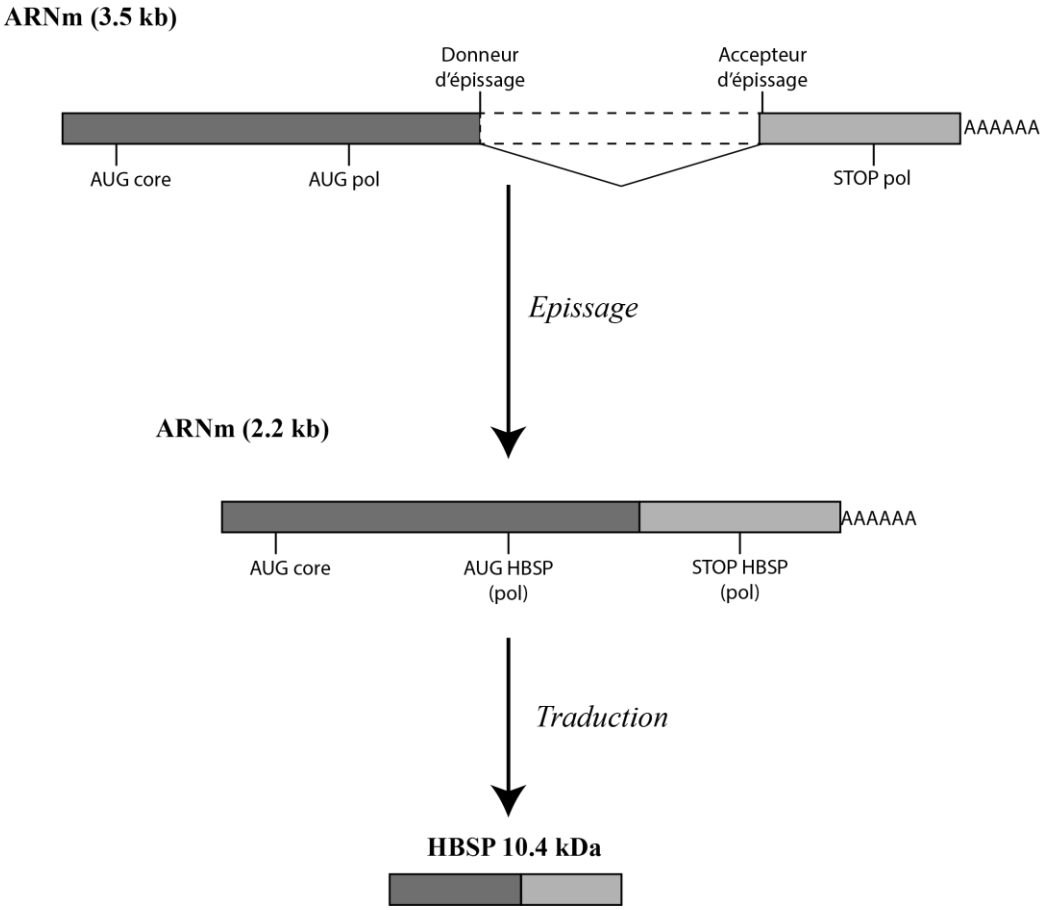


Figure 16 : Epissage et traduction de l'ARNm de la protéine HBSP. L'ARN pré-génomique est épissé via les sites donneur et accepteur afin de donner naissance à un ARNm de 2.2kb. Ce dernier est alors traduit à partir du codon d'initiation de la polymérase jusqu'au codon STOP en une protéine appelée HBSP de 10.4kDa (inspiré de (Soussan et al. 2000)).

5. Le cycle viral

Le cycle viral du VHB est composé de plusieurs étapes, de l'entrée dans la cellule, à la décapsidation du génome dans le noyau jusqu'à la sécrétion de particules matures. Ces différentes étapes seront détaillées dans les paragraphes suivants.

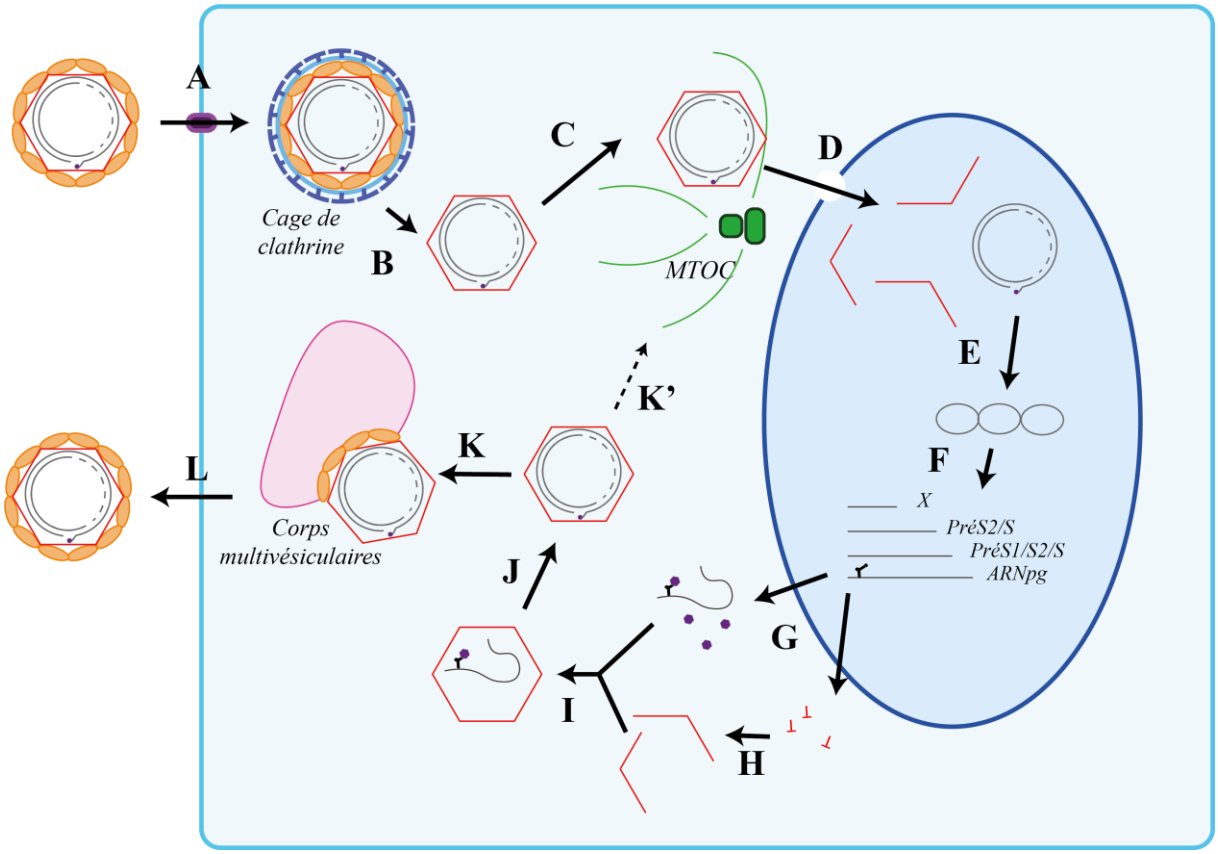


Figure 17 : Schéma du cycle viral du VHB. Le virion s'attache aux protéoglycanes à héparane sulfate puis entre dans la cellule en interagissant avec le récepteur NTCP (A) par un mécanisme clathrine-dépendant. La nucléocapside est libérée dans le cytoplasme (B) avant d'être adressée au noyau par les microtubules (C). La nucléocapside passe le pore nucléaire dans lequel elle se désassemble et libère son génome (D). L'ADNrc est complété et devient l'ADNccc, forme épisomale du VHB (E). L'ADNccc sert de matrice pour la transcription des 4 ARN viraux : X, PréS2/S, PréS1/PréS2/S et l'ARNpg (F). L'ARNpg code pour la polymérase et la core. La polymérase s'attache au domaine ε de l'ARNpg (G). La protéine core se dimérise puis s'assemble en capside (H). L'ARNpg complexé à la polymérase est encapsidé (I) avant d'être rétro-transcrit (J). La nucléocapside désormais mature pourrait renflouer le stock d'ADNccc (K') de façon minoritaire. La nucléocapside mature est enveloppée au niveau des MVB (K), puis sécrétée. (L)

5.1. Attachement du virus à la cellule : liaison aux protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG) (Figure 17, A)

Le virus de l'hépatite B a un tropisme hépatocytaire. Les protéines d'enveloppe interagissent dans un premier temps avec les protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG), et plus particulièrement les glypicanes-5, via les résidus Arg-122 et Lys-141 de l'HBs (Leistner, Gruen-Bernhard, et Glebe 2007; Verrier et al. 2016). Ces HSPG sont particulièrement exprimées dans l'espace de Disse, à l'interface entre l'endothelium des vaisseaux sanguins et des hépatocytes (Hayes et al. 2016; Glebe 2007). Des travaux récents suggèrent également un rôle du récepteur humain aux LDL dans l'attachement du virus à la cellule (Y. Li et Luo 2021).

5.2. Entrée dans la cellule : l'interaction avec le récepteur NTCP (Figure 17, A).

A la suite de l'interaction faible avec les HSPG, le VHB interagit avec une forte affinité avec le hNTCP. Codé par le gène SLC10A1, le récepteur humain se dénomme polyprotéine cotransporteur du sodium/taurocholate (NTCP). Il fut mis en évidence en 2012 après plusieurs suggestions de potentiels récepteurs du VHB telles que les récepteurs de l'IL6, de l'albumine, ou encore de la transferrine (Yan et al. 2012). Le NTCP est un transporteur d'acides biliaires que l'on peut retrouver dans les PHH frais ou d'autres cellules permissives. Néanmoins, son expression est éteinte dans les cellules dédifférenciées, ce qui explique pourquoi les lignées hépatocytaires de laboratoire ne permettent pas l'infection par le VHB. Il a été montré dans cette même publication de Yan et al. que la surexpression de NTCP dans des lignées hépatocytaires (HepG2-NTCP) les rendaient permissives pour l'infection, ce qui confirme le rôle de ce co-transporteur dans l'entrée virale.

Récemment, l'EGFR, récepteur du facteur de croissance épidermique, a été montré comme étant également important dans l'infection. Son inhibition, par des petits ARN interférents ou par un inhibiteur, provoque une diminution drastique de l'infection. Il est ainsi proposé comme étant un cofacteur nécessaire à l'entrée virale (Iwamoto et al. 2019).

5.3. Internalisation du virus (Figure 17, A, B)

En coordination avec l'EGFR, le NTCP va permettre d'internaliser le virus en suivant la voie dépendante de la clathrine. La protéine adaptatrice AP2 se lie à la partie cytosolique du NTCP et à la clathrine afin d'internaliser le VHB. L'endocytose serait donc clathrine dépendante (Umetsu et al. 2018; Iwamoto et al. 2020; Herrscher et al. 2020). Néanmoins d'autres auteurs ont montré une endocytose cavéoline dépendante (Macovei et al. 2013).

L'endocytose clathrine-dépendante se poursuit généralement par une fusion avec un compartiment endosomal qui va être maturé en endosome tardif. Ces mécanismes sont régulés par des guanosines triphosphates (GTP), de la superfamille des Ras : les protéines Rab. Rab5 est responsable du passage de la membrane plasmique à l'endosome précoce et Rab7 est quant à elle responsable du passage de l'endosome précoce à l'endosome tardif et aux lysosomes (Hayes et al. 2016). C'est à cette étape entre l'endosome tardif et le lysosome que le virus est supposé sortir afin de poursuivre son cycle directement dans le cytosol (Figure 17, B). Les mécanismes d'échappement à la voie de dégradation du lysosome sont encore mal connus, néanmoins quelques études ont mis en évidence le rôle fusogène de certaines régions des protéines de surface :

-La région N-terminal de la protéine S, entre les aa 164 et 186, dépendante d'un pH faible (Rodriguez-Crespo et al. 1994).

-La moitié C-terminale du domaine pré-S2, entre les aa 149 et 160, indépendante du pH (Oess et Hildt 2000).

-La région pré-S1, notamment sa partie N-terminale entre les acides aminés 9 et 24, de façon dépendante d'un pH faible (Delgado et al. 2015; Somiya et al. 2015).

Par conséquent les mécanismes conduisant à l'échappement du virion ne sont pas encore bien compris mais un mécanisme de fusion de l'enveloppe du VHB avec l'endosome tardif à faible pH pourrait conduire à la libération de la nucléocapside dans le cytosol.

5.4.Entrée dans le noyau (Figure 17, C, D)

Une fois la nucléocapside délivrée dans le cytosol, elle est importée à proximité des pores nucléaires avec un mécanisme tubuline-dépendant probablement via une interaction entre la capside et la chaîne légère LC8 de la dynéine de type-1 (DynLLC1) (Osseman et al. 2018; Rabe, Glebe, et Kann 2006) (Figure 17, C).

A cette étape, les capsides seraient reconnues par des importines permettant l'import nucléaire (Figure 17, D). L'importine est constituée de deux sous-unités : la sous-unité α se lie classiquement avec les motifs NLS tandis que la sous-unité β permet l'adressage des protéines aux complexes des pores nucléaires. Il a été montré *in vitro* que l'importine-β était capable de se lier à HBc ou à la capside sans apport d'importine-α. Le CTD a un rôle dans cette interaction qui ne nécessite pas de phosphorylation dans des conditions où les capsides sont vides (C. Chen

et al. 2016). D'autres auteurs ont montré, en utilisant des capsides matures issues de cellules, que les importine α étaient nécessaire à l'interaction avec l'importine β. Ils montrent également en utilisant des capsides issues de RRL que la phosphorylation est cruciale pour l'interaction avec les importines (Kann et al. 1999). Il est possible que la phosphorylation des capsides matures permette d'exposer le CTD hors de la capside par répulsion électrostatique avec l'ADNrc et ainsi de le rendre disponible pour l'interaction (Heger-Stevic et al. 2018).

L'importine peut alors adresser la capside au noyau. Le pore nucléaire est un grand complexe protéique constitué de nucléoporines (Nups) formant deux anneaux permettant une ouverture à travers l'enveloppe nucléaire et d'une structure en panier. Cette dernière est notamment composée de la protéine Nup153, capable d'interagir avec la capside avec une forte affinité. Des auteurs montrent que les capsides matures localisées dans ces pores nucléaires peuvent interagir avec la protéine Nup153 via leur NTD se désassemblent et diffusent dans le noyau (Schmitz et al. 2010). La même équipe a observé que les capsides dites matures, contenant de l'ADNrc, pouvaient se désintégrer tandis que les capsides dites immatures, contenant de l'ARNpg, étaient piégées dans les pores nucléaires (Rabe et al. 2003). En effet l'ADN est une molécule rigide qui déstabilise la capside, ce qui pourrait améliorer la cinétique de décapsidation (Dhason et al. 2012). Il a également été montré *in vitro* sur des capsides vides que l'importine pouvait les déstabiliser (C. Chen et al. 2016). Finalement, la déstabilisation de la capside induit alors la diffusion de dimères dans le noyau qui sont alors capables de s'associer avec des facteurs nucléaires de la cellule, avec l'ADNccc ou bien de se réassocier en capsides (Rabe et al. 2009).

La deuxième possibilité pour l'entrée dans le noyau serait une décapsidation du complexe pol-ARNpg dans le cytoplasme. En effet, la polymérase contient un NLS bipartite entre les résidus 90 et 109 de la région TP qui pourrait être reconnu par les importines (Lupberger 2013). De la même manière, d'autres équipes ont observé la présence de capsides sensibles à la DNase I dans le cytoplasme, ce qui sous-entendrait une dissociation, ne serait-ce que partielle, de la capside (H. Guo et al. 2007). Néanmoins, ce mécanisme reste à être étudié plus en profondeur étant donné que la présence d'un ADN viral dans le cytoplasme pourrait être détectée par le système immunitaire inné.

5.5.La conversion de l'ADNrc en ADNccc (Figure 17, E)

L'ADNrc, une fois rentré dans le noyau, est converti en ADN circulaire clos de façon covalente (ADNccc)(Figure 18, E). Tout d'abord, la liaison covalente entre la polymerase et l'extrémité 5' du brin négatif de l'ARNpg est hydrolysée, probablement par une protéine comme la protéine TDP2 (Tyrosyl-DNA-phosphodiesterase 2)(Königer et al. 2014). Cette extrémité est alors libre et forme un complexe triple-brin dans la région appelées « r ». Le mécanisme de complétion qui suit reste mal connu mais la polymérase κ pourrait fonctionner de pair avec la polymérase γ afin de compléter le brin positif. La région « r » doit alors être clivée afin de ne laisser que deux brins. En parallèle, l'amorce ARN qui a servi à la complétion du brin positif lors de la transcription inverse de l'ARNpg est toujours présente et doit également être clivée afin de permettre la formation de l'ADNccc. FEN-1 a notamment été suggérée comme endonucléase responsable de ces clivages. L'ADNrc pourra ensuite être ligué sur les deux brins notamment par la ligase 1 (Wei et Ploss 2020). Par ailleurs, des topoisomérases cellulaires seraient également impliquées dans les étapes de synthèse et de ligation (Sheraz et al. 2019). En plus de ces activités, elles permettent le superenroulement de l'ADN ainsi circularisé. Cette forme superenroulée est appelée ADNccc (ADN circulaire covalamment clos) et formera enfin un complexe nucléoprotéique similaire à celle de la chromatine (Diogo Dias, Sarica, et Neuveut 2021; Levrero et al. 2009).

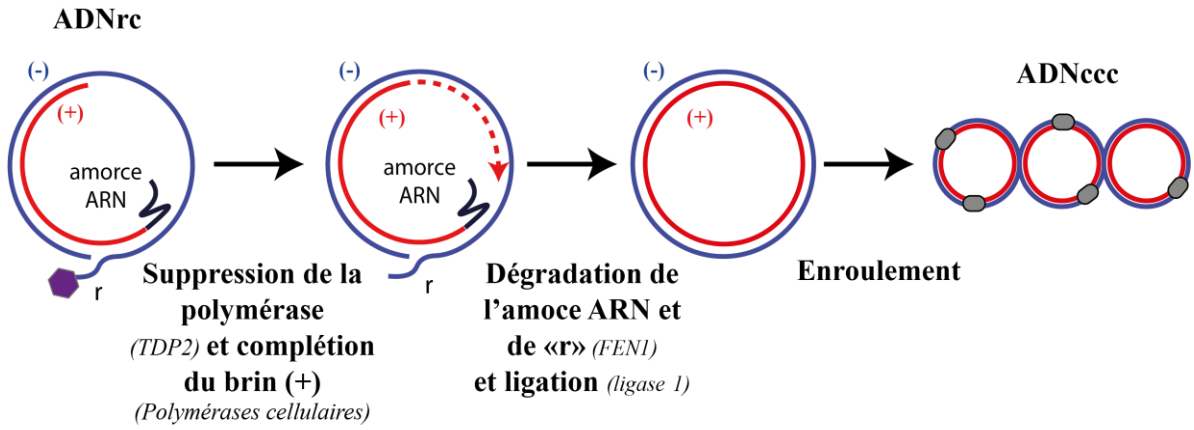


Figure 18 : Schéma de la conversion de l'ADNrc en ADNccc. Les étapes sont affichées en gras et des exemples d'enzymes suggérées comme impliquées dans ces mécanismes son indiqués en italique. La polymérase est détachée de l'ADNrc et le brin positif (+) est complété. L'amorce ARN et la région « r » sont dégradées puis l'ADN double brin et forme un complexe nucléoprotéique. (Inspiré de (Diogo Dias, Sarica, et Neuveut 2021))

La forme épisomale du VHB, l'ADNccc, est associée aux histones cellulaires. Ainsi des modifications épigénétiques pourront augmenter ou diminuer l'accessibilité des promoteurs

viraux. Les histones méthyltransférases (HMT) ou les histones acétyltransférases (HAT) ajouteront des groupements –méthyl ou –acetyl tandis que les histones déacétylases (HDAC) et les histones déméthylases (HDMT) les enlèveront. Cette régulation épigénétique fait partie des réponses de la cellule pour réduire l'expression des protéines virales. Par exemple, la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 réprime l'expression de l'ADNccc. Une protéine virale, la protéine HBX, peut contrecarrer cette réponse cellulaire en inhibant ces mécanismes de répression. Il est par exemple également suggéré qu'elle permette d'augmenter l'expression de l'ADNccc en inhibant les mécanismes de désacétylations cellulaires. L'hyperacétylation permet de relâcher la structure de l'ADNccc et donc son expression. Par conséquent, une corrélation a été observée entre l'acétylation de l'ADNccc et la virémie de patients chroniquement infectés (Pour plus d'informations : (Rivière et al. 2015; Tian et al. 2013)).

La protéine core est également importante pour l'expression de l'ADNccc. Une équipe a par exemple pu observer qu'en mutant les cluster d'arginines du domaine C-terminal de la core, l'expression de l'ADNccc était diminuée (Chong et al. 2017).

5.6.La production des transcrits viraux (Figure 17, F)

L'ADNccc sert alors de matrice pour la transcription d'ARN viraux par la polymérase II cellulaire. Différents ARNm décrits auparavant seront produits (PréS2/S, PréS1/PréS2/S, X) ainsi que l'ARN pré-génomique (Figure 17, F). Celui-ci servira alors pour la traduction de la polymérase, de la core et de l'antigène HBe, mais il sera également la matrice pour la transcription inverse en ADNrc. Ces ARN viraux sont donc exportés vers le cytoplasme avant d'être traduit et, pour l'ARNpg, encapsidé.

Les ARN viraux contiennent des éléments de régulation post-transcriptionnels (PRE) dans la région 1151-1582. Ces éléments permettraient l'export du noyau, mais également des mécanismes d'épissages. Des travaux récents suggèrent également que la stabilité des ARN viraux est renforcée par une zone d'interaction avec les protéines PAPD5 et PAPD7 dans ces PRE. Ces interactions permettraient de limiter les mécanismes cellulaires d'exonucléase de la queue poly-adénylée des ARNm (F. Liu et al. 2021).

Les différentes protéines virales seront alors traduites. L'AgHBe sera sécrété par la voie classique RE/Golgi. La protéine HBX va quant à elle pouvoir activer la transcription de l'ADNccc, agir sur le stress oxydatif, la prolifération cellulaire, l'apoptose, le protéasome mais également sur la transcription de l'ADNccc (Fu et al. 2016). Les protéines d'enveloppe seront

traduites et s'enchassseront dans la membrane du RE. Celles-ci ont été retrouvées par colocalisation dans les corps multivésiculaires (MVB) (Tokiko Watanabe et al. 2007). Les particules sous-virales iraient dans les compartiments transitoires entre le RE et le golgi : l'ERGIC. Les protéines d'enveloppes vont alors pouvoir s'homo-oligomériser et s'hétéro-oligomériser afin de former les particules sous-virales ou d'envelopper les nucléocapsides (Short et al. 2009; Patient, Hourioux, et Roingeard 2009).

5.7.La formation du complexe ARN pré-génomique / polymérase (Figure 17, F)

L'ARNpg permet la traduction de la polymérase. Celle-ci interagit avec plusieurs protéines de chocs thermiques (HSP40, 70, 90) qui, grâce à leur activité ATP-dépendante permettent d'assurer le bon repliement de la protéine afin de maintenir une conformation de la polymérase propice à l'interaction avec la boucle ε. Par ailleurs, l'HSP90 a également été retrouvée dans les nucléocapsides contenant de l'ADN (J. Hu 1997; Jianming Hu et Seeger 1996). Ceci est corrélé avec d'autres travaux montrant que les HSP70 et 90 permettraient de façon synergique d'accélérer la formation de capsides, et ce notamment par interaction de l'HSP90 avec les dimères de core (Seo, Seo, et Jung 2018, 90; Shim et al. 2011). Ces résultats suggèrent que l'interaction pol/core a lieu via des dimères de core à partir desquels se forment la capside ou bien qui sont ajoutés à des structures préexistantes.

La polymérase interagit ensuite avec l'ARNpg (Figure 17, G). Une fois correctement conformée, elle peut se lier avec la boucle ε de l'ARNpg via la tige la plus apicale et le renflement interne, située entre les deux tiges (S. A. Jones et al. 2012). Bien que la boucle apicale d'ε ne semblerait pas indispensable à l'interaction avec la polymérase, celle-ci est essentielle pour l'encapsidation du complexe pol-ARNpg en interagissant potentiellement avec des facteurs cellulaires faciliant ce mécanisme. De manière intéressante, Ralf Bartenschlager a suggéré une action en cis de la polymérase : synthétisée, elle serait rapidement repliée et interagirait directement avec son ARNpg. Ce complexe entre ensuite en interaction avec les protéines core (R Bartenschlager et Schaller 1992; R Bartenschlager, Junker-Niepmann, et Schaller 1990; Jianming Hu 2009) (Figure 17, I).

5.8.La formation de la nucléocapside

La cinétique de formation du complexe tripartie core-pol-ARNpg est jusqu'à présent peu décrite (Cf. Partie II.5.4.1.). Un travail récent de Luo et al. a mis en évidence les résidus

essentiels pour l'encapsidation de l'ARNpg *in cellulo* par transfection de plasmides. En utilisant des mutants de la protéine core, ils ont mis en évidence l'importance de certains résidus qui, une fois mutés, n'impactent pas l'assemblage de la capside mais l'encapsidation de l'ARNpg. Il s'agit des résidus : P25, T33, S106 et W102. Ils montrent également que le mutant Y132A, incapable d'activer l'assemblage, n'interagit pas avec la polymérase. Les auteurs suggèrent donc que l'interaction core-pol aurait lieu avec des formes intermédiaires de la capside capables de s'assembler mais pas avec les dimères libres (Y. Luo et al. 2021). En complément de cette interaction, la phosphorylation a un rôle majeur dans l'encapsidation spécifique de l'ARNpg (Cf. Partie II.5.4.3.).

Patel et al. ont identifié des séquences en tiges-boucles très conservées au sein de l'ARNpg appelées signaux d'encapsidation (PS) qui sont capables *in vitro* d'interagir directement avec la protéine core. Ces séquences nécessitent davantage d'investigations i*n vivo*, néanmoins cette interaction pourrait avoir des fonctions dans la formation de la nucléocapside. L'interaction core-ARN permettrait d'activer la nucléation de l'assemblage, tout en gardant une spécificité pour l'ARNpg via ces PS. L'interaction avec ces signaux d'encapsidation semble néanmoins sensible à la phosphorylation. Le groupe du Dr. Stockley a ainsi étudié l'interaction d'HBc avec le PS1 avec et sans phosphorylation. La phosphorylation conduit à l'inhibition de cette interaction.

La polymérase interagit alors avec la protéine core pour commencer le mécanisme d'encapsidation de l'ARNpg. L'interaction core/pol semble être indépendante de la présence d'ARNpg comme les travaux de Lott et al. ont pu le montrer. Ils ont ainsi mis en évidence l'interaction core/pol sans ARN. L'interaction est suggérée comme ayant lieu entre la partie C-terminale de la core et les domaines RT et TP (Lott et al. 2000).

En conclusion l'encapsidation de l'ARNpg et de pol est multifactorielle (Figure 17, I). Les résidus impliqués dans la liaison inter-dimères, la phosphorylation, l'interaction avec la polymérase et la reconnaissance directe de l'ARNpg par la core sont complémentaires et permettraient une encapsidation spécifique. Néanmoins ce phénomène semble peu efficace, ce qui se traduierait par la présence d'au moins 90% de capsides vides observées en cellules et dans les sérums de chimpanzés et de patients (Ning et al. 2011; Luckenbaugh et al. 2015; Alberti et al. 1978; Kaplan et al. 1976).

5.9.La rétro transcription de l'ARNpg en ADNrc

Une fois le complexe pol-ARNpg-core formé, l'ARNpg est rétro-transcrit (Figure 17, J). La polymérase synthétise une amorce de 4 pb complémentaire à la séquence 5'-UUCA3' du renflement de la tige-boucle ε. Elle est alors hybridée à l'amorce sous forme d'un hétéroduplexe ADN/ARN via sa tyrosine 63.

Cette amorce est ensuite transférée sur la DR1 de la région 3' et la synthèse du brin ADN négatif est initiée (Figure 19, B). Pendant cette transcription le domaine RNAse H de la polymérase hydrolyse l'ARNpg (Figure 19, C) à l'exception d'une amorce d'ARN en 3' (Figure 19, D). Il y a alors deux voies possibles ; Si l'amorce reste liée à la région 3', la polymérase continue la synthèse depuis cette amorce, ce qui aboutit à un ADN double brin linéaire (Figure 19, I). La seconde voie consiste en une translocation de cette amorce vers la région DR2 présente en 5' (Figure 19, E). La polymérase va alors continuer la synthèse jusqu'à l'extrémité 5', permettant la synthèse du domaine DR1 (Figure 19, F). Le DR1 en 5' va ainsi pouvoir s'hybrider avec le DR1 en 3', ce qui va permettre la circularisation du génome (Figure 19, G). La polymérase continue alors la synthèse depuis cette hybridation en 3' et s'arrêtera aux environs du 2400ème nt donnant naissance à l'ADNrc (Figure 19, H) (N. Liu et al. 2004).

Les transferts entre les extrémités 5' et 3' pourraient être facilités par l'interaction entre le signal φ et la tige-boucle ε. Néanmoins dans 10% des cas, le transfert depuis la région DR1 en 3' vers la région DR2 en 5' n'a pas lieu, et la synthèse aboutit en un ADN double-brin linéaire. Celui-ci pourra alors être recyclé vers le noyau des hépatocytes, et être intégré dans les le génome de l'hôte (Michael Nassal 2008; Beck et Nassal 2007).

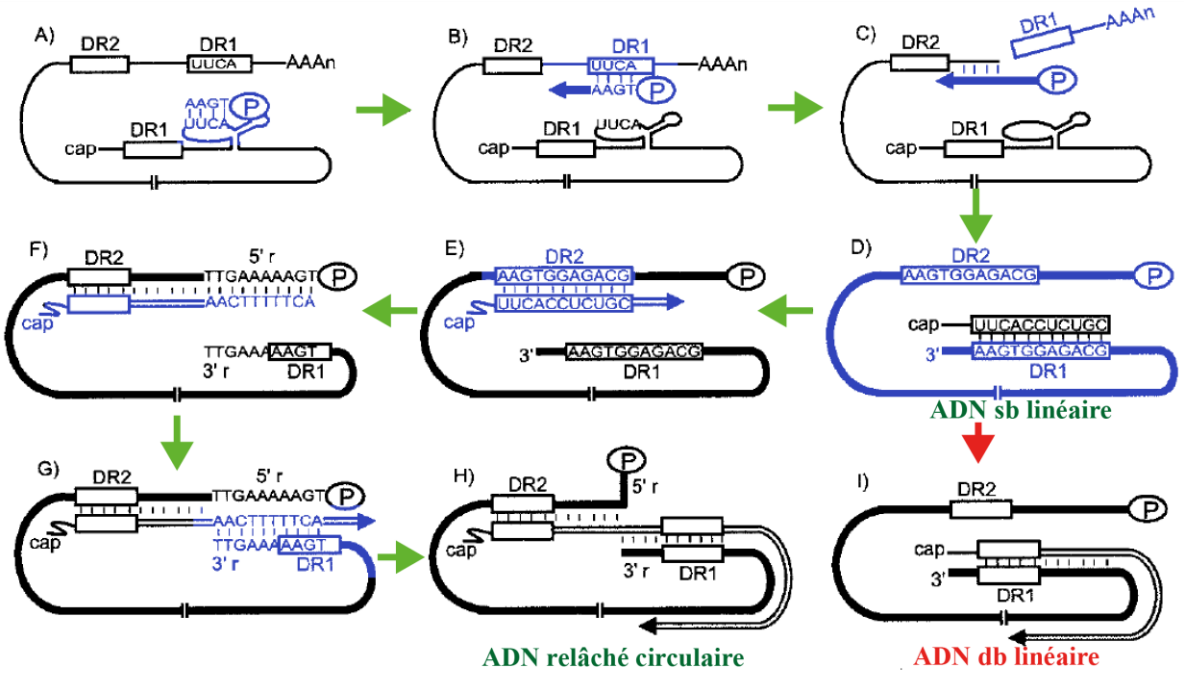


Figure 19 : Rétro-transcription de l'ARN pré-génomique. A) Hybridation de la polymérase à l'ARN pré-génomique. B) Transfert de l'amorce depuis la tige-boucle ε vers le DR1 en 3' de l'ARNpg. C) Élongation du brin d'ADN (-) et dégradation de l'ARNpg par le domaine RNase H de la polymérase. D) Obtention de l'ADN simple brin linéaire, l'extrémité 5' de l'ARNpg n'est pas dégradé afin de servir d'amorce pour la synthèse du brin d'ADN (+). E) Transfert de l'extrémité 5' de l'ARNpg vers le DR2 de l'extrémité 3'. F) Elongation à partir de l'amorce ARN jusqu'à l'extrémité 5'r. G) Hybridation des deux régions DR1 en 5'r et 3'r, formant un complexe triple brin. H) L'ADN (+) est synthétisé en poursuivant à partir de l'extrémité 3'r de ADN (-). I) Formation d'un ADN double brin linéaire à partir de l'amorce constituée par l'extrémité 5' résiduelle de l'ARN pré-génomique. (adapté de (N. Liu et al. 2004))

Des travaux montrent que la core peut agir en tant que protéine chaperone des acides nucléiques au cours de la transcription inverse, via ses ARD comme précédemment décrit partie II.4.4.3. Un second mécanisme de transfert de brin pourrait également être permis par l'interaction avec le signal d'encapsidation PS1 décrit par Patel et al. En effet, celui-ci est situé très proche du signal φ, qui est capable d'interagir de façon base-dépendante avec la boucle 5' ε. L'interaction de la core avec le PS1 pourrait ainsi permettre de rapprocher ces deux régions afin de permettre l'initiation de la transcription inverse, qui se poursuit par une translocation de l'amorce située en 5'ε vers le DR1 en 3' (Patel et al. 2017; Oropeza et McLachlan 2007) (Figure 20).

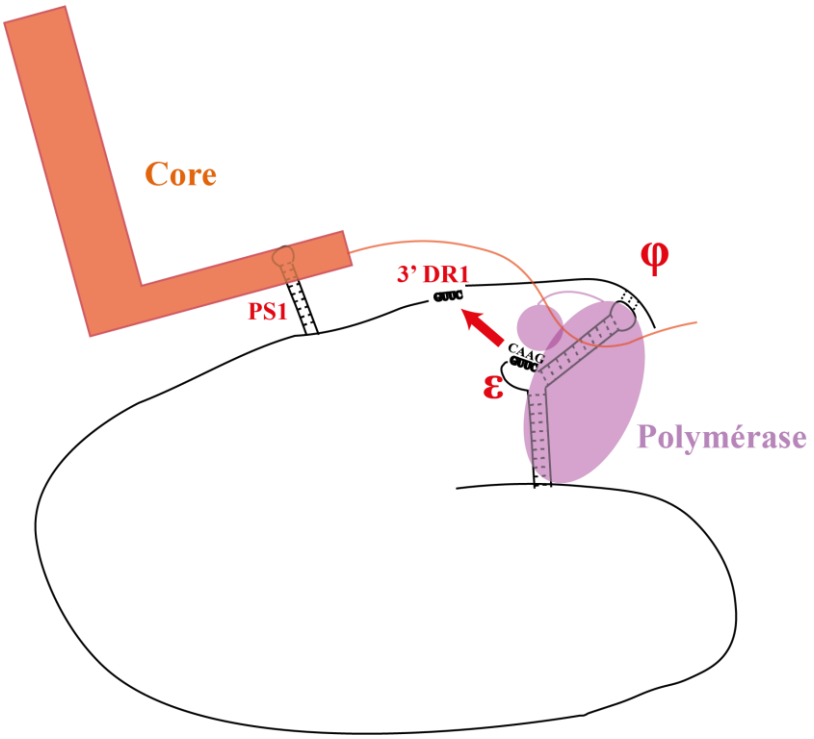


Figure 20 : Schéma de l'activité de transfert de brin de la core suggérée par Patel et al. La protéine core interagit via son CTD avec la polymérase. La polymérase interagit avec le domaine epsilon de l'ARNpg et synthétise une amorce. L'ARNpg interagirait avec la protéine core via le signal d'encapsidation PS1. Le domaine φ et l'ε sont alors disposés à proximité de sortes à ce que la polymérase puisse faire un transfert de son amorce depuis le renflement du domaine ε vers la séquence identique de φ.

5.10. L'enveloppement

L'enveloppement a ensuite lieu par interaction entre la protéine core et la protéine d'enveloppe L. Cette interaction a lieu entre les domaines MD de l'enveloppe et MBD de la capside (Cf. Partie II.5.4.1.)(Pastor et al. 2019; Ponsel et Bruss 2003). Des études suggèrent le rôle complémentaire d'interactions électrostatiques entre l'extrémité de la pointe de core chargée négativement et des domaines riches en arginines de la protéine d'enveloppe (au niveau du domaine préS et Cyt-1 du domaine S) (Seitz et al. 2007). L'interaction entre la core et la protéine d'enveloppe S a également été rapporté en présence de la protéine L, ce qui suggère un rôle de plateforme de la protéine L dans l'assemblage (Pastor et al. 2019).

L'enveloppement pourrait être déclenché par un signal de la protéine core. Jusqu'ici, ce signal était proposé comme étant le résultat d'une maturation de la capside avec des changements structuraux provoqués par la synthèse de l'ADNrc qui est plus rigide que l'ARN, par l'augmentation de charges négatives ou d'autres effets inconnus induits par cette synthèse. Par conséquent, seules les capsides matures émettraient ce signal. Ce modèle d'enveloppement

est néanmoins contredit par plusieurs observations de la sécrétion de virions vides ou contenant de l'ARN. L'équipe de Jianming Hu propose par conséquent un modèle où l'enveloppement dépendrait de deux signaux : le signal de sécrétion I (SS1) qui correspondrait au linker et au CTD de la core tandis que le signal de sécrétion II (SS2) pourrait être induit par des modifications du MBD (Partie II.5.4.1.). Le SS1 serait alors exposé de façon constitutive par les capsides vides, qui pourraient par conséquent être enveloppées. Il n'est également pas exclu que le SS2 puisse également être activé mais ne serait pas essentiel à l'enveloppement. L'enveloppement des capsides immatures serait bloqué par la séquestration du SS1 et par un signal de blocage induit par la présence d'ARNpg ou d'ADN simple brin. Ce signal de blocage serait alors levé par le SS2, qui permettrait ainsi l'enveloppement des capsides matures. En parallèle, il est également possible que la séquestration du SS1 soit également levée par la transcription inverse et que l'association du SS1 et du SS2 active l'enveloppement des capsides matures. Toutefois, le mécanisme des sécrétion des virions contenant de l'ARNpg reste à être précisée (K. Liu et Hu 2019). Ce modèle est en accord avec l'exposition du CTD (Partie II.5.4.3.). En parallèle une étude récente suggère le rôle de la poche hydrophobe de la core dans l'enveloppement, qui pourrait par conséquent faire partie du SS2 (Lecoq et al. 2021).

5.11. Rôle de l'autophagie et des corps multivésiculaires dans la morphogenèse

Il a été établi que la voie de l'autophagie était largement détournée par le VHB (Figure 17, K). La protéine X permet notamment de stimuler la formation d'autophagosomes tout en inhibant la formation d'autolysosomes qui dégraderaient les protéines virales. Les membranes des autophagosomes seraient détournées afin de servir d'échafaudage pour la formation des nucléocapsides. Il est ainsi tout autant question de rôle dans la « réplication » de par l'encapsidation de l'ARNpg que dans la formation de la capside qui est stabilisée par ces structures. Ainsi il a été révélé que l'inhibition de nombreuses protéines autophagiques était délétère pour la sécrétion de particules infectieuses mais également pour la sécrétion de capsides nues (Döring et al. 2018; Döring et Prange 2015; Christina Bartusch, Tatjana Döring, et Reinhild Prange 2017). Il a ainsi été démontré que le VHB utilisait le complexe d'élongation ATG5-12-16L1 afin d'établir l'échafaudage nécessaire à sa réplication (J. Li et al. 2011). La protéine core est capable d'interagir avec l'ATG12 via son domaine « IDR » (« Intrinsically disordered region ») afin d'établir cet échafaudage. Cette structure possèderait également un rôle dans l'enveloppement de la protéine de capside (J. Li et al. 2011; Döring et al. 2018; Lin et al. 2020). La sécrétion des particules virales ne sera pas particulièrement décrite dans ce

manuscrit. Néanmoins un modèle intéressant présente la sécrétion comme un phénomène dépendante des fonctions lysosomales et du marqueur Rab7, associé aux autophagosomes et aux MVB. L'enveloppement pourrait avoir lieu dans des MVB mais également dans des autophagosomes qui possèderaient des structures tubulaires induites par la protéine pré-core et permettraient de rediriger les virions dans les MVB pour sécrétion (J. Inoue et al. 2015; Tokiko Watanabe et al. 2007).

5.12. La voie alternative : le retour des nucléocapsides vers le noyau

Une autre voie existe pour les nucléocapsides : le recyclage vers le noyau (Figure 17, K', Figure 21). Ce mécanisme permettrait d'augmenter la quantité d'ADNccc par ré-import nucléaire des nucléocapsides matures. Ce mécanisme a tout d'abord été montré pour l'hépatite B du canard (Tuttleman, Pourcel, et Summers 1986). L'équipe du Dr. Protzer a alors suggéré ce mécanismes pour l'hépatite B humaine (Ko et al. 2018). Ce recyclage de la capside permettrait d'alimenter le stock d'ADNccc et de participer à sa maintenance et son activation. Des modèles mathématiques démontrent que, si ce modèle existe, la quantité de nucléocapsides recyclées serait bien inférieure à celles des nucléocapsides sécrétées. Ces modèles sont appuyés par les données montrant que la quantité d'ADN viral sérique est largement supérieur à l'ADN viral intra-hépatique (Nakabayashi 2016). Récemment, l'équipe de Stephan Urban a suggéré que ce phénomène était probablement très minoritaire. Ainsi la synthèse, et le recyclage de capsides formées *de novo* ne serait pas indispensable à la maintenance et à la régulation transcriptionnelle de l'ADNccc. Les infections *de novo* seraient par conséquent le principal moyen d'alimententation du stock d'ADNccc (Tu et al. 2021). Des travaux récents de l'équipe d'Anna Salvetti révèlent que la protéine core est capable d'interagir avec l'ADNccc directement après l'entrée dans le noyau (en *cis*), et ce de façon stable et jusque 6 semaines après l'infection en cellules dHepaRG. Cette interaction serait ainsi indépendante de la synthèse *de novo* de protéines core et donc du recyclage des nucléocapsides (Lucifora et al. 2021).

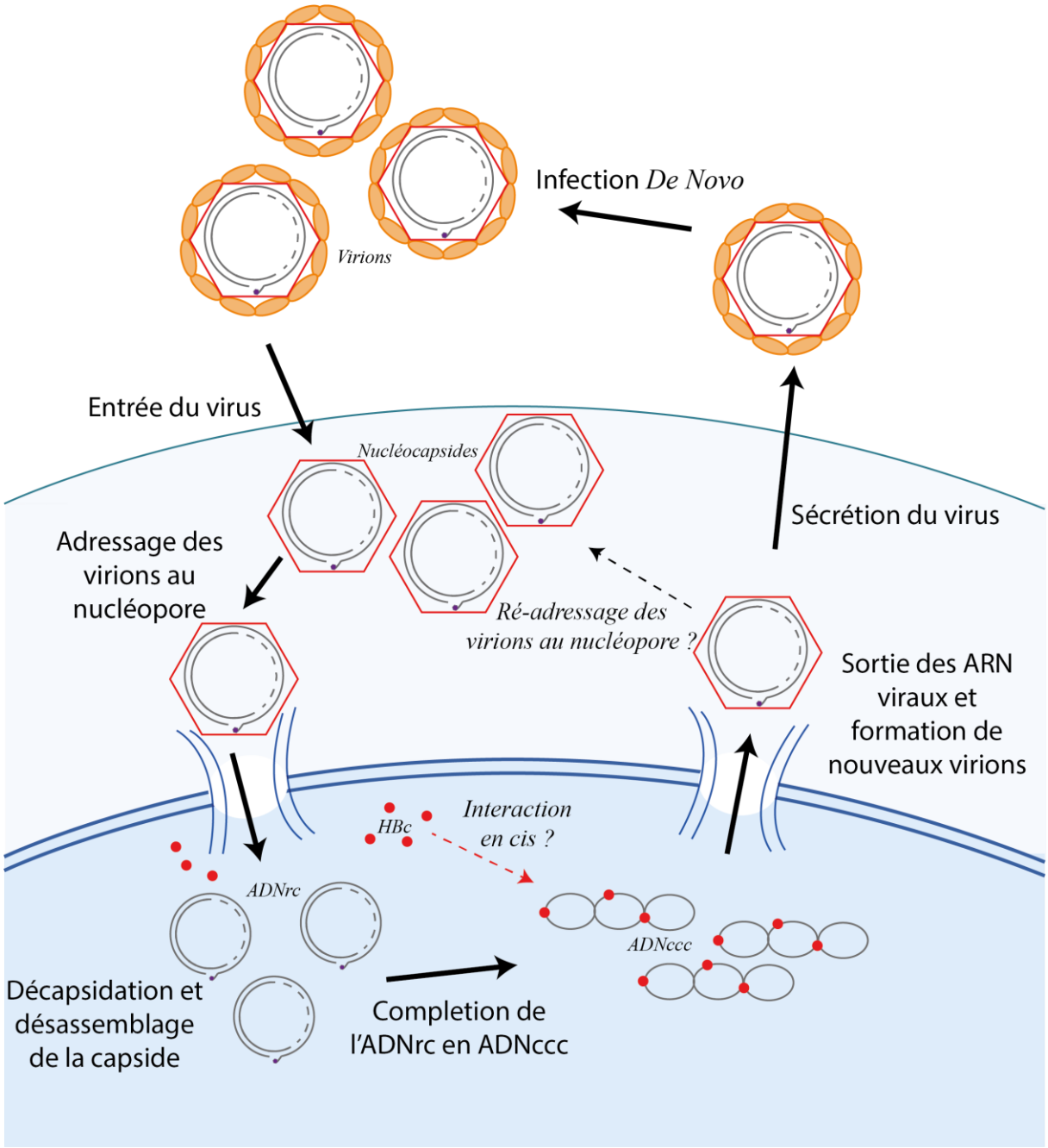


Figure 21 : Schéma des mécanismes possibles pour l'activation transcriptionnelle et la maintenance de l'ADNccc par la protéine core (HBc). Les deux possibilités sont illustrées par des flèches en pointillés : les nucléocapsides formées *de Novo* seraient réimportées vers le noyau afin de permettre l'interaction core/ADNccc et de renflouer le stock d'ADNccc (Flèche pointillée noire) ; La protéine core interagirait en cis avec l'ADNccc après désassemblage et l'apport de core et d'ADNrc *de novo* serait dispensable. La réinfection par des particules formées *de novo* est connue comme étant possible et est ici illustrée sur la partie haute du schéma.

III. Traitements

Les traitements sont généralement indiqués dans les phases de clairance immunitaire et de réactivation virale. Deux catégories de traitements sont actuellement disponibles : les immunomodulateurs et les analogues nucléot(s)idiques.

Les différents marqueurs utilisés pour déterminer l'avancée de la pathologie sont les antigènes HBs et HBe, les anticorps anti-HBs, anti-HBe et anti HBc, détectés par des techniques immuno-enzymatiques, la mesure de la charge virale par des méthodes de qPCR, le taux d'ALAT et la détermination du niveau de dégradation du foie par un score lésionnel, le score METAVIR en France. L'antigène HBcrAg est un biomarqueur composé des antigènes HBcAg, HBeAg et de p22cr qui a été utilisé pour des suivis thérapeutiques. L'utilisation de cet antigène semblerait également être un bon indicateur de l'activité de l'ADNccc (Asselah 2019; Testoni et al. 2019). Enfin l'utilisation de micro-ARN en tant que biomarqueurs a également été suggérée, et permettrait le diagnostic de la fibrose (Loureiro et al. 2020). En cas d'échec thérapeutique, il est recommandé d'identifier et de comparer les mutations de résistance avec les mutations connues par génotypage afin d'adapter le traitement. Toutefois il arrive que l'identification de mutations de résistance ne soit pas suffisante pour empêcher un échec thérapeutique, ainsi, il a été suggéré de combiner l'approche génotypique avec une approche phénotypique de détermination de l'EC_{50} des isolats afin de mettre à jour les traitements adaptés aux résistances (Marlet et al. 2020).

1. Les traitements actuels

1.1. Les immunomodulateurs

Les immunomodulateurs sont une catégorie d'agents thérapeutiques visant à stimuler la réaction du système immunitaire afin de contrôler l'infection. L'interféron (IFN) de type I et plus précisément les IFNα et β en font partie et sont connus pour leurs propriétés antivirales. L'interféron est une cytokine sécrétée naturellement par les cellules dendritiques plasmacytoïdes qui en stimulant les gènes associés, appelés ISG (gènes stimulés par l'interféron), vont permettre de diminuer la charge virale par des mécanismes cellulaires de dégradation. Dans le cas de l'infection à HBV, une diminution de l'activation des interférons α/β a été observée. L'injection d'IFN permet donc de rétablir cet équilibre et d'activer les ISG, comme par exemple, un gène codant pour une protéine appelée MxA. La sécrétion de MxA va alors pouvoir empêcher l'export des ARN messagers viraux du noyau vers le cytoplasme (Gordien et al. 2001). Les IFN diminuent également l'expression de l'ADNccc. De même, ces

immunomodulateurs permettent de réactiver l'APOBEC3G qui est inhibé par le VHB. L'APOBEC3G provoque alors des hypermutations des adénines en guanines au sein du génome viral transcrit (Woo, Kwok, et Ahmed 2017). Enfin l'IFN-α-PEG stimule la prolifération et l'activité antivirale des cellules NK, associée à la réduction d'antigènes HBs.

En absence de contre-indication, le traitement à l'IFN peut être utilisé en première intention dans le traitement de l'hépatite B chronique. L'IFN α-2a dénommé Roferon-A fût la première forme utilisée en 1990 puis améliorée par l'ajout d'un polyéthylène glycol (PEG) afin d'augmenter son temps de demi-vie et en conséquence son efficacité. En présence avec des analogues nucléos(t)idiques, L'IFNα-2a-PEG (Pegasys) permet une très nette réduction de la charge virale. Toutefois si ces cytokines sont efficaces, cela reste limité par les effets secondaires : syndrome grippal, perte de poids, rougeurs mais aussi des effets psychiques allant de la simple irritabilité aux syndromes dépressifs sévères (Janssen et al. 2005). C'est pour cette raison que le traitement à l'IFN est généralement prescrit pour 48 semaines, seul ou en combinaison avec des analogues nucléos(t)idiques (Particulièrement le Tenofovir Disoproxyl Fumarate), en injection hebdomadaire sous-cutanée. L'IFN a pour effet la séroconversion en antigènes HBe et HBs permettant un effet soutenu après l'arrêt du traitement. En revanche, l'efficacité est relativement hétérogène et dépend de facteurs tels que le genre féminin, les génotypes A et B ou encore de faibles taux sériques d'ADN viral (Woo, Kwok, et Ahmed 2017). Chez les patients traités, l'administration est efficace pour 20 à 30% et réduirait le risque de cirrhose.

1.2.Les analogues nucléot(s)idiques (NUCs)

La seconde stratégie thérapeutique actuelle est l'utilisation d'analogues nucléot(s)idiques (NUCs) par voie orale. Ces molécules ciblent la polymérase virale, inhibant la réplication et par conséquent prévenant l'infection de cellules saines, ce qui permet alors au système immunitaire de prendre le relais afin de contrôler l'infection. Ces traitements sont utilisés en première intention et lorsqu'il n'est plus possible d'espérer une séroconversion par le traitement avec des interférons, sont prescrits à vie.

Ces molécules sont divisées en deux classes, les analogues nucléotidiques et nucléosidiques qui diffèrent par leur structure chimique. Ils sont globalement à spectre large, et par conséquent sont utilisés pour le traitement du VIH ou de l'herpès simplex. Les analogues nucléosidiques nécessitent une triple phosphorylation par des kinases cellulaires, lorsque les

analogues nucléotidiques possèdent déjà ce groupement phosphate. Les analogues nucléosidiques sont au nombre de 4 ; la Lamivudine (LAM, Zeffix), l'Adefovir dipivoxil (ADV, Hepsera), l'Entecavir (ETV, Baraclude), et la Telbivudine (LdT, Tyzeka), et il existe 2 analogues nucléotidiques ; le Tenofovir disproxil fumarate (TDF, Viread) et le Tenofovir alafenamide (TAF, Vemlidy). La majorité de ces molécules agissent en tant que terminateurs de chaîne obligatoires, c'est-à-dire qu'ils bloquent la synthèse d'ADN/ARN de par l'absence du groupement 3'-hydroxyl, nécessaire à l'attachement du nucléotide suivant. D'autres analogues, comme l'Entecavir, ou le Ganciclovir, sont des terminateurs de chaîne non obligatoires, en effet, ils possèdent un 3'-hydroxyl, mais celui-ci est stériquement encombré ou soumis à des conformations contraignantes (De Clercq 2011). La Lamivudine fut la première molécule utilisée et approuvée en 1998, néanmoins l'apparition de résistances et le développement de nouveaux antiviraux ont conduit les hautes autorités de santé à conseiller l'utilisation de l'Entecavir et du Tenofovir en priorité. Il est toutefois possible, en France, de prescrire en cas de contre-indications ou de résistances la Lamivudine et l'Adefovir (Cf. Vidal).

L'Entecavir fut alors utilisée dès 2005, agissant en tant qu'analogue carboxylique de la guanosine. Cet analogue nucléotidique permet à la fois d'inhiber la transcription inverse de l'ARN pré-génomique, la synthèse de l'ADN(+) mais une inhibition du priming de la polymerase virale a également été montré *in vitro*. De façon différente des autres terminateurs de chaine, l'Entecavir n'induit pas la terminaison de chaine instantanément mais permet l'incorporation de quelques nucléotides avant l'arrêt. L'Entecavir possède une haute barrière de résistance, nécessitant trois mutations avant l'apparition de clones résistants. Ainsi, l'apparition de résistances à l'Entecavir n'arrive que dans 1.2% des cas après 5 ans de thérapie.

Le Tenofovir disproxil fumarate (TDF) est la prodrogue du Tenofovir qui après phosphorylation inhibe de façon compétitive le deoxyadenosine 5'-triphosphate, agissant en tant que terminateur de chaîne. Le TDF possède une haute barrière de résistance, toutefois il possède une toxicité rénale bégnine. Le Tenofovir alafenamide (TAF) fut développé et testé et a reçu une autorisation mise sur le marché sur le sol français. C'est également une prodrogue du Tenofovir qui est conçue pour diminuer les concentrations plasmatiques et donc les effets secondaires. Il fait actuellement parti des stratégies thérapeutiques disponibles, aussi efficace que son prédécesseur le TDF tout en ayant une meilleure biodisponibilité (Fung et al. 2011). Commercialisé sous le nom de Vemlidy, il est autorisé en Europe mais n'est toutefois pas commercialisé en France.

1.3.Les immunoglobulines dirigées contre l'hépatite B

Une troisième alternative existe avec les immunoglobulines dirigées contre l'hépatite B (HBIGs). Les HBIGs sont des anticorps dirigés contre l'épitope situés au sein du domaine préS1 des protéines d'enveloppe L (Partie II.5.3.). Ils possèdent une activité neutralisante forte via leur liaison à l'enveloppe des virions, et empêchent ainsi l'interaction avec le récepteur hNTCP. Ils permettent de prévenir l'infection de façon prophylactique chez les patients qui vont recevoir une transplantation. En combinaison avec des analogues nucléos(t)idiques, ces immunoglobulines permettent de grandement réduire la réinfection de foies transplantés chez les patients infectés par le VHB. Les HBIGs préviennent également la transmission verticale (mère-enfant) en association avec la vaccination. Ces immunoglobulines sont issues de dons, ce qui implique que le traitement est à la fois limité, couteux en termes de temps et manque d'efficacité contre les mutants de la protéine S. L'utilisation de ces anticorps est actuellement limitée à ces actions prophylactiques (Urban et al. 2014).

2. Les traitements en cours de développement

Malgré un bon contrôle par ces traitements, l'infection reste dans la majorité des cas chronique. La forme épisomale du virus, l'ADNccc, reste inaccessible par les analogues nucléot(s)idiques et l'interféron possède une efficacité limitée, ce qui en fait le réservoir du VHB. C'est pour cette raison que des antiviraux à action directe ainsi que d'autres alternatives sont actuellement en développement. Parmi ceux-ci les inhibiteurs d'entrée, les modulateurs allostériques de l'assemblage, les modulateurs de la réponse immunitaire et les inhibiteurs de sortie.

Des modulateurs de la réponse immunitaire sont actuellement en cours d'essais cliniques. Ces modulateurs permettraient l'activation de gènes réprimés par le VHB et de restaurer une réponse immunitaire innée et adaptative (NCT03615066, NCT04189876, NCT04465890) (Boni et al. 2018, 7).

Une des stratégies actuelles contre le VHB est l'utilisation des ARN interférents (ARNsi) et d'oligonucléotides anti-sens (ASOs). Ils agissent sur l'expression des protéines virales, en activant la dégradation des ARN viraux (NCT044490029, NCT03365947)(Roca Suarez, Testoni, et Zoulim 2021).

Des inhibiteurs de sortie (les REP) interagissent avec les protéines d'enveloppe du VHB et préviennent la sécrétion de particules sous-virales, ce qui permet au système immunitaire de prendre le relais (NCT02565719) (Bazinet et al. 2020; Blanchet et al. 2019).

Des inhibiteurs de l'entrée sont en développement. Parmis ces inhibiteurs, le SALP permettrait d'empêcher l'interaction entre le virus et les HSPG, plateforme d'attache du VHB. De nouveaux anticorps produits en cellule de rein embryonnaire humain (HEK293T) possèdent le même mécanisme que les HBIGs et pourraient permettre de s'affranchir des limitations de dons qui jusque-là sont l'unique moyen d'obtenir des anticorps efficaces (Wi, Jeong, et Hong 2017).

La découverte du rôle du NTCP en tant que récepteur cible du VHB a conduit à des études sur des substrats permettant d'inhiber l'entrée virale. L'Ezetimibe, initialement utilisé dans l'hypercholestérolémie, en est un exemple et suite à des études sur son action inhibitrice de l'entrée du VHB, cet inhibiteur a pu être approuvé. Des inhibiteurs du NTCP sont en phase d'essais cliniques. Parmis ceux-ci, le Myrcludex fait partie des peptides synthétiques dérivés du préS1, domaine de l'enveloppe qui permet l'interaction du virus avec le NTCP de la cellule. Il a comme avantage considérable le fait qu'il ne soit pas internalisé dans la cellule et que la concentration nécessaire pour l'inhibition de l'infection soit bien inférieure à la concentration requise pour l'entrée d'acides biliaires, substrats naturels du récepteur. Il est donc peu toxique. Le Myrcludex B est actuellement autorisé dans le cadre du traitement de patients infectés par le virus de l'hépatite D sous le nom Hepcludex/Bulevirtide (Herrscher, Roingeard, et Blanchard 2020; Urban et al. 2014).

3. Les inhibiteurs de type modulateurs allostériques de l'assemblage de la protéine core

Les modulateurs allostériques de l'assemblage de la capside d'HBV (CpAMs) sont divisés en deux classes en fonction de leur mécanisme d'action. La **classe I** est composée des phenylpropénamides (PPA), des sulfamoylbenzamides (SBA) et autres dérivés qui préviennent l'encapsidation de l'ARN pré-génomique. La **classe II** est composée des hétéroarylpyrimidines (HAP) et induit la formation de capsides malformées qui seront dégradés.

Historiquement, l'AT-61 (**Classe I**) fût la première découverte pour ses propriétés de réduction de l'ADN viral. Les travaux de King et al, ont ainsi montré que cet effet était polymérase-indépendant, et que son utilisation diminuait l'encapsidation de l'ARNpg (King et

al. 1998). L'équipe d'Adam Zlotnick a ensuite travaillé sur une molécule fluorescente capable de se lier à la protéine core d'HBV et a observé un effet du BIS-ANS (**Classe II**) sur l'assemblage (Adam Zlotnick et al. 2002). Karl Deres et al. ont alors pu étudier les effets de dérivés du BIS-ANS, le BAY-41-4109 et le BAY-38-7690 qui font tous deux partie de la **classe II**, ouvrant le domaine d'étude des CpAMs (Deres et al. 2003).

Ces nouveaux inhibiteurs ont un effet sur la réplication du VHB mais permettraient aussi de diminuer le taux d'ADNccc, et donc potentiellement de soigner l'infection chronique. En revanche, les concentrations nécessaires pour atteindre une réduction significative du taux d'ADNccc sont généralement 10 fois plus élevées que l'EC_{50} de la réduction du taux d'ADN viral. C'est pas exemple le cas du JNJ-6379 qui a une EC_{50} sur l'ADN viral de 93nM contre 876nM sur l'ADNccc (Berke et al. 2020). L'AT-130 et l'ENAN-34017 (**Classe I**), le BAY41-4109, le GLS4 (**Classe II**) sont d'autres exemples de CpAMs qui permettent de réduire le taux d'ADNccc, à des concentrations élevées, ce qui suggère que cet effet est propre à ce type d'inhibiteurs (Berke et al. 2017; F. Guo et al. 2017; Lahlali et al. 2018).

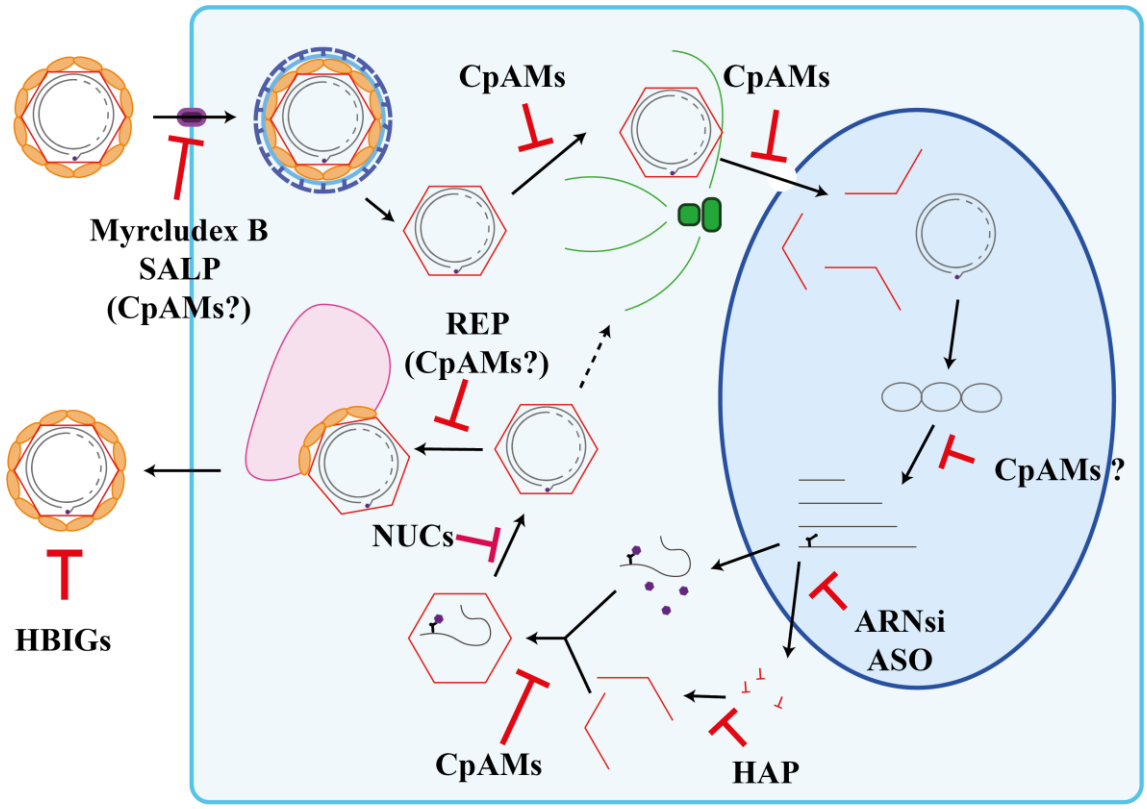


Figure 22 : Schéma du cycle viral et des étapes visées par les inhibiteurs actuels et en cours d'essais cliniques. Le Myrcludex B prévient l'attachement du virion au NTCP tandis que le SALP préviendrait l'attachement aux HSPG. Les CpAMs interviennent dans différentes étapes du cycle : l'assemblage, les étapes post-entrée, la maintenance de l'ADNccc et l'encapsidation. Il a été suggéré d'utiliser des CpAMs dirigés contre les étapes d'entrée de la nucléocapside. Ces inhibiteurs interagissant avec la protéine core, essentielle pour l'activation transcriptionnelle de l'ADNccc, ils pourraient avoir un rôle dans l'expression de la forme épisomale du VHB. Les NUCs quant à eux, déjà utilisés contre l'infection par le VHB, visent l'étape de transcription inverse de l'ARNpg. Les ARN interférents et les oligonucléotides anti-sens visent les étapes de traduction en détruisant l'ARNm. Les REPs préviendraient l'enveloppement de la nucléocapside en interagissant avec les protéines d'enveloppe. Enfin les HBIGs, immunoglobulines dirigées contre les virions du VHB, agissent sur les virions sécrétés.

3.1.Cible des CpAMs

Ces inhibiteurs ciblent la poche hydrophobe d'HBc. Cette poche est un domaine crucial pour la conformation de la protéine core, et sa modulation provoque des modifications importantes. La poche hydrophobe, aussi appelée « poche HAP » est constituée d'une interface concave qui est principalement composée de l'hélice α1, de la boucle connectant les hélices α1 et α2, de l'hélice α4b et α5 (Wynne, Crowther, et Leslie 1999). Elle est, au cours de l'assemblage, recouverte par l'hélice α5 et la boucle du CTD provenant du dimère adjacent (Figure 23) (Klumpp et al. 2015).

Les CpAMs des deux classes se logent dans cette poche hydrophobe. De façon plus précise, l'interface concave du dimère est constituée des résidus F23, P25 de la seconde boucle, D29, L30, T33 et L37 de l'hélice α2, W102, I105, S106, T109 et F110 de l'hélice α4, Y118 et F122 de l'hélice α5, I139, L140 et S141 de la boucle 6. Le couvercle formé par le dimère adjacent est constitué des résidus V124, W125 et R127 de l'hélice α5 et des résidus T128,P129, Y132, R133 et P134 de la sixième boucle (Figure 23 et 22) (Viswanathan et al. 2020; Klumpp et al. 2015).

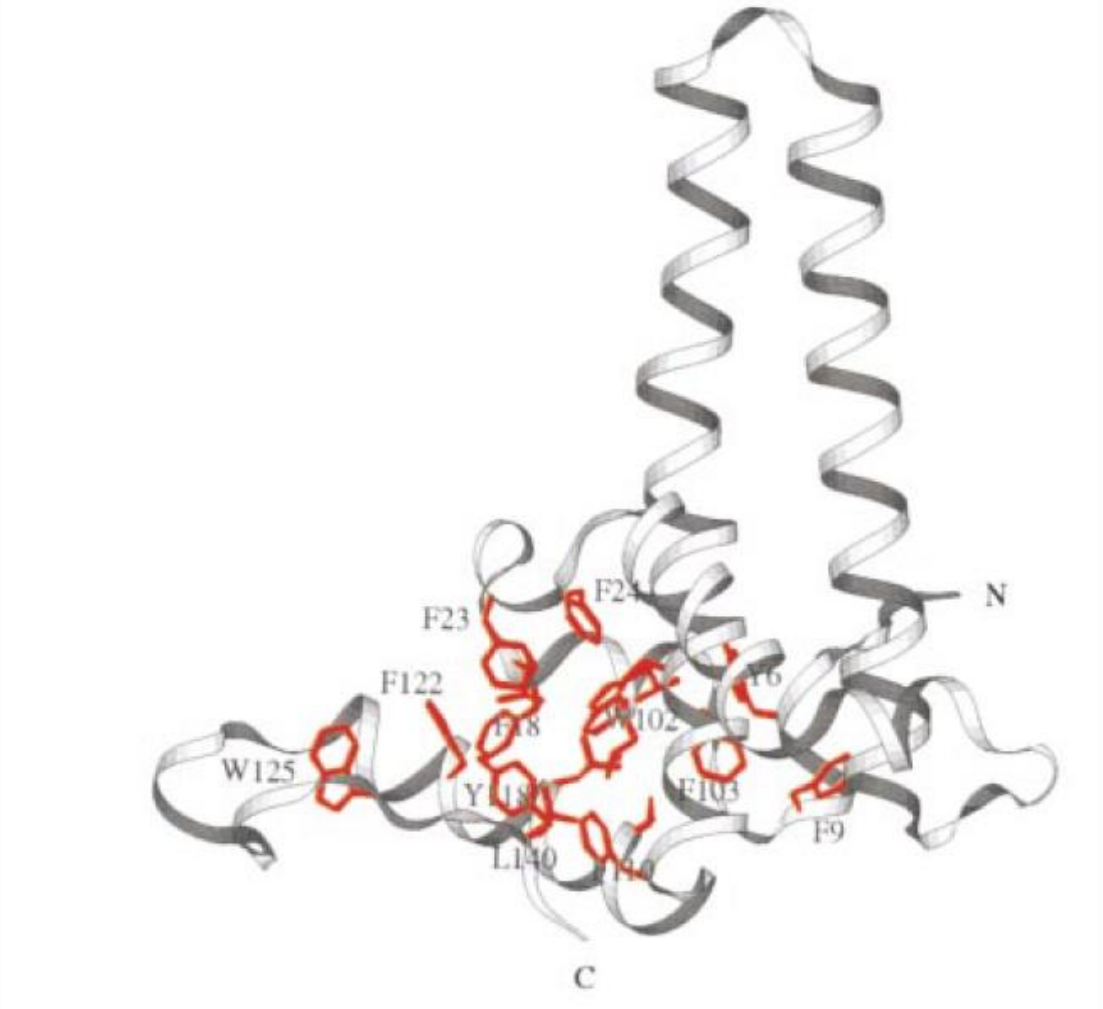


Figure 23 : Représentation des résidus impliqués dans la formation de la poche hydrophobe d'HBc. (Résidus Y6, F9, L15, L16, F18, L19, F23, F24, W102, F103, F110, V115, Y118, L119, F122, W125 et L140) (Extrait de (Wynne, Crowther, et Leslie 1999)).

3.2.Mécanistique

3.2.1. Site d'interaction et affinité de conformation

Les CpAMs des deux classes interagissent avec la poche hydrophobe de la core, néanmoins, les différences phénotypiques qui seront décrites dans la suite de ce manuscrit suggèrent des interactions différentes avec la core.

Des auteurs ont observé par cristallographie l'établissement d'une liaison hydrogène entre les CpAMs et le résidu W102 de core (Trp102). Bien que les deux classes occupent le même site, et interagissent avec le même résidu W102, leur structure chimique différente pourrait être responsable des différences de phénotypes. Des travaux suggèrent que la **classe II** pourrait induire des réarrangements locaux au niveau du résidu F23, essentiel pour l'assemblage, tandis que la **classe I** n'y aurait pas accès. Les auteurs suggèrent également qu'en contraste avec la flexibilité des molécules de **classe I**, la rigidité de la **classe II** pourrait avoir des effets différents sur la capside et par conséquent aboutir à des capsides malformées. (Katen et al. 2013; Zhou et al. 2017).

De façon complémentaire, des travaux ont montré que les différences de phénotypes seraient également dues à des différences d'affinité en fonction de la conformation d'HBc. Les CpAMs sont présentés comme des modulateurs allostériques de la protéine core car ils induisent un changement de conformation local de la structure et modifient son activité, ce qui aboutit à différents résultats qui seront décrits dans les paragraphes suivants. Ces inhibiteurs ont également une affinité qui diffère en fonction de la conformation initiale du monomère de core. Pour rappel, la protéine core existe en monomères de conformation A, B, C ou D appelés quasi-équivalents (Cf. Partie II.5.1.). Des travaux ont montré qu'un inhibiteur de **classe II** (HAP1) avait une affinité accrue pour le quasi-équivalent C tandis qu'un inhibiteur de **classe I** (AT-130) aurait une préférence pour le quasi-équivalent B. (Katen et al. 2013).

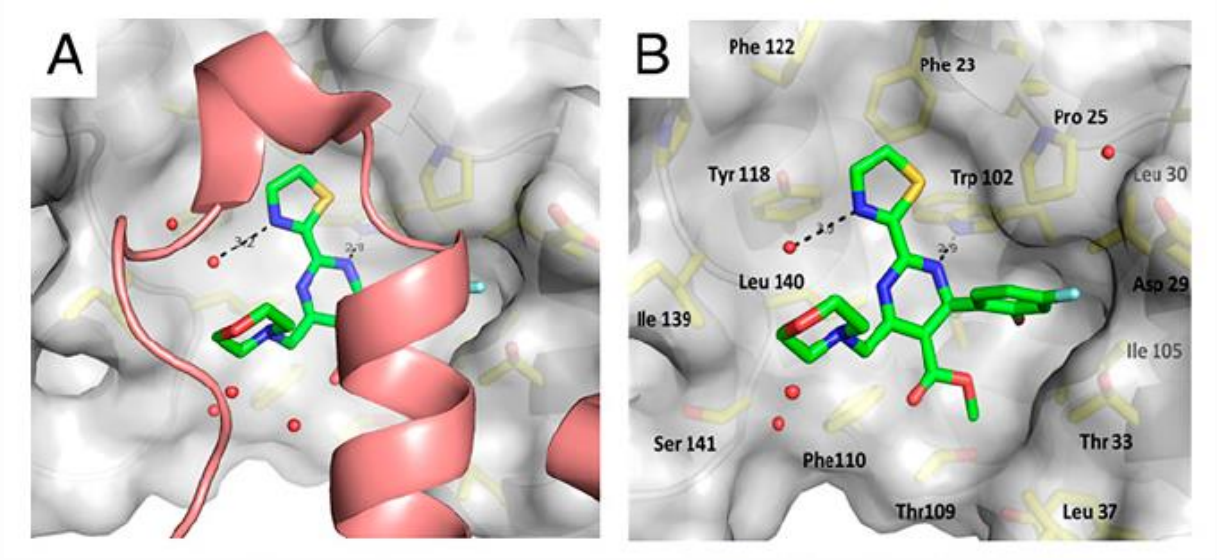


Figure 24 : Représentation tridimensionnelle de l'interaction entre la protéine core et les CpAMs. A) Représentation de la poche renfermant une molécule de type CpAMs : des résidus hydrophobes situés dans le châssis de la core forment une structure concave permettant de loger la molécule. Cette interface est recouverte par l'extrémité C-terminale du domaine N-terminal du dimère adjacent, composée de l'hélice α5 et de la boucle 6. B) Représentation d'une molécule de type CpAMs logée dans la poche hydrophobe et de résidus composant l'interface concave. L'inhibiteur forme ici une liaison hydrogène via ses azotes (représentés en bleu) avec la chaîne latérale des résidus W102 (Trp102) et L140 (Leu140). Le groupement thiazol (dont l'atome S est représenté en jaune) est à proximité du résidu F23 (Phe23) et pourrait induire des réarrangements locaux. Cette représentation a été produite à partir de core tronquée (Cp149) en utilisant l'inhibiteur de **classe II** NVR 010-001-E2 et extraite de (Klumpp et al. 2015).

3.2.2. Effet des CpAMs sur l'assemblage de la capside

Les inhibiteurs de **classe I** augmentent la cinétique d'assemblage de la capside mais sans provoquer leur déformation (Figure 25). Ces inhibiteurs stabilisent modestement les dimères entre eux et leur rôle antiviral demeure dans l'accélération de la cinétique d'assemblage (Katen et al. 2010). Les capsides ainsi formées sont morphologiquement identiques aux capsides sauvages mais ne sont pas dégradées (Zhou et al. 2017; Feld et al. 2007; Corcuera et al. 2018). Wu et al. suggèrent que l'accélération de l'assemblage serait également associé à une altération fine des nucléocapsides (S. Wu et al. 2018). Des travaux sur un inhibiteur de la famille des GLP (**classe I**) montrent néanmoins que l'assemblage en présence de cet inhibiteur aboutit à la formation de capsides malformées (Amblard et al. 2019).

Les inhibiteurs de **classe II** renforcent davantage l'association entre les dimères, ce qui les stabilise, et module la formation de la capside. Un premier rôle antiviral aurait lieu via leur effet sur la cinétique d'assemblage, et notamment son accélération, à des concentrations substoechiométriques (< 1 drogue/dimère). L'EC_{50} et le K_d décris par Deres et al. sont très similaires, et des auteurs suggèrent par conséquent que l'effet biologique de cet inhibiteur

débute avec ce premier mécanisme d'accélération de l'assemblage (Stray et al. 2005), qui pourrait prévenir l'encapsidation de l'ARNpg (Lam et al. 2017). À des concentrations plus élevées (> 1 drogue/dimère), ces inhibiteurs déstabilisent les capsides et aboutissent à la formation de capsides aberrantes : mal formées, ouvertes, parfois en tubes ou en feuillets (Figure 25) (Zhou et al. 2017; C. Bourne et al. 2008; Stray et Zlotnick 2006; Stray et al. 2005; Deres et al. 2003). Suite à cet effet directement sur les protéines, ces inhibiteurs induisent une dégradation par le protéasome, ce qui correspond au deuxième rôle antiviral de cette classe d'inhibiteurs (Deres et al. 2003; Zhou et al. 2017). Des auteurs suggèrent que ces deux effets stabilisateurs des dimères et déstabilisateurs des capsides pourraient être causés par deux sites de liaison différents (Stray et Zlotnick 2006).

Finalement, l'équipe d'Adam Zlotnick a pu montrer que les différences de phénotypes pourraient être dues à des changements de conformations. La capside est une structure flexible capable de s'adapter aux changements de conformations, comme ceux induits par la **classe I**. Au contraire, la **classe II** induit des conformations qui empêcheraient à la capside de s'adapter et par conséquent aboutiraient à la formation de capsides aberrantes. Par conséquent, selon les auteurs, bien que la capside puisse se former sous la pression exercée par la **classe I**, sa stabilité est plus faible que celle des capsides malformées induites par la **classe II** (Katen et al. 2013).

En résumé, la **classe I** augmente la cinétique d'assemblage et prévient l'encapsidation de l'ARNpg (Berke et al. 2017; Corcuera et al. 2018; Lam et al. 2017; Feld et al. 2007). La **classe II** augmente également la cinétique d'assemblage mais promeut la formation de capsides aberrantes et la dégradation de protéines core (Figure 25) (Klumpp et al. 2015; Stray et Zlotnick 2006; Stray et al. 2005).

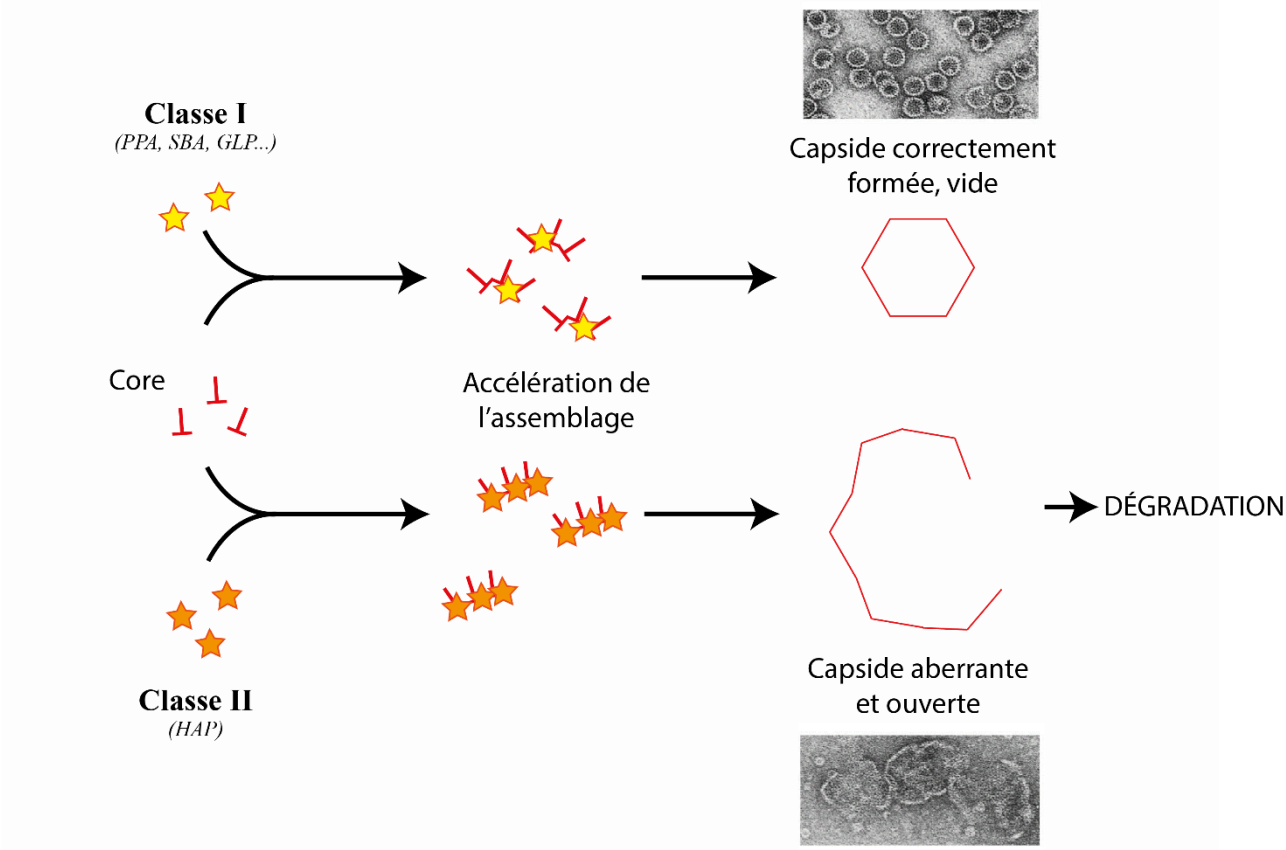


Figure 25 : Schéma du mode de fonctionnement des CpAMs. La **classe I** accélère l'assemblage et provoque la formation de capsides morphologiquement comparables aux capsides sauvages mais inhibe l'encapsidation de l'ARNpg. La **classe II** accélère également l'assemblage et induit la formation de capsides aberrantes et la dégradation de protéine core. Ces deux types de capsides sont illustrés par des images de microscopie électroniques extraites de (Hacker et al. 2003).

3.2.3. Effet des CpAMs sur les capsides préformées et sur les premières étapes de l'infection

Des inhibiteurs de la **classe I**, de la famille des SBA, n'auraient pas d'effet sur les capsides préformées (Schlicksup et al. 2020). Néanmoins certains inhibiteurs de cette classe, de la famille des GLP, permettraient d'augmenter davantage la stabilité des capsides et induisent la formation de capsides fermes et plus petites (Amblard et al. 2019).

Les CpAMs de la **classe II** sont capables de déstabiliser les capsides préformées (Figure 25) et d'induire la formation de structures aberrantes (Stray et Zlotnick 2006; Schlicksup et al. 2020; 2018; Qazi et al. 2018; Ko et al. 2019). Néanmoins en système cellulaire, l'utilisation du HAP_R01 ne semble pas provoquer un désassemblage de la capside. Toutefois, les auteurs observent un déplacement de la bande correspondant à la capside sur un gel SDS-PAGE natif révélé par western blot (Ko et al. 2019). Ce résultat s'explique par une altération de la structure

générale de la nucléocapside plutôt que par une modification de sa taille ou de son poids (Schlicksup et al. 2020; S. Wu et al. 2018).

En cohérence avec leur action sur les capsides préformées, une nouvelle utilisation de ces inhibiteurs en tant qu'inhibiteurs des étapes précoces de l'infection se profile. Ko et al. ont montré que l'incubation de cellules ou de virions avec un inhibiteur de **classe II** avant l'infection diminuait la quantité de marqueurs associés aux VHB (ADN viral, ADNccc, HBeAg). En plus de prévenir l'accumulation d'ADNccc dans le noyau en interagissant directement avec les nucléocapsides en transit dans le cytoplasme, ces inhibiteurs ont ainsi également une action sur les virions du milieu extracellulaire. Les auteurs suggèrent que les inhibiteurs pourraient passer la bicouche lipidique de l'enveloppe et altérer directement les nucléocapsides. Cet effet n'a néanmoins pas été observé en utilisant un inhibiteur de **classe I** (Ko et al. 2019; Berke et al. 2017).

3.3.Les résistances

La cinétique d'assemblage de la protéine core est fortement corrélée à l'efficacité des CpAMs mais elle conditionne également les résistances. Ainsi l'équipe d'Adam Zlotnick a montré en mutant le résidu T109 que, lorsque la cinétique d'assemblage induite par une mutation était plus rapide, les capsides possédaient une certaine résistance à ces inhibiteurs. En revanche lorsque la cinétique d'assemblage se trouve diminuée, les inhibiteurs possèdent alors une activité plus forte (Ruan, Hadden, et Zlotnick 2018). Cela pourrait se traduire par une affinité différente, et par conséquent tout mutant plus stable entrerait en compétition avec l'inhibiteur. Néanmoins, la cinétique d'assemblage et l'augmentation de la stabilité induite par ces mutants modifient également l'encapsidation du complexe pol-ARNpg et la transcription inverse. L'équipe d'Adam Zlotnick a également travaillé sur le mutant V124W qui possède une sensibilité réduite aux inhibiteurs de classe I et II. Ils ont mis en évidence que malgré cette résistance, les nucléocapsides produites contenaient nettement moins d'ADN viral (Tan et al. 2013; Katen et al. 2013). Néanmoins, Zhou et al. ont retrouvé des mutants réplicatifs de résistances aux classes I et II, au niveau des résidus P25 et T33, retrouvés chez des patients (Zhou et al. 2017).

3.4.Les inhibiteurs en essais cliniques

Plusieurs molécules appartenant aux deux classes de CpAMs sont actuellement en essais cliniques. Le NVR 3-778 est le premier CpAMs (**classe I**) à avoir fait ses preuves en essais cliniques. Il induit une diminution de la réplication virale en monothérapie ou en combinaison

avec l'interferon pégylé allant jusque 2 log_{10} de copies/mL de génome viral (NCT02401737) (M. F. Yuen et al. 2019). Depuis, de nouvelles générations d'inhibiteurs ont montré de meilleures efficacités (Figure 18).

Parmi les inhibiteurs en essais cliniques de **classe I,** l'ABI-H0731 est actuellement en phase 2, bien toléré par les patients avec peu d'effets secondaires (NCT04781647). Des réductions de l'ordre de 1.5 à 2.7 log_{10} de copies/mL ont été observées. Les auteurs ont également fait une étude clinique comparative entre l'Entecavir donné seul et l'Entecavir (ETV) en association avec l'ABI-H0731. La combinaison ETV+ABI-H0731 présente une meilleure réduction du taux d'ADN viral (jusque 5.3log_{10}) mais également d'ARN pré-génomique, témoin de l'activité de l'ADNccc (Sulkowski et al. 2019; M.-F. Yuen et al. 2020). Le JNJ-6379 est actuellement en phase II en association avec l'interféron pégylé et induit des réductions de la réplication virale allant jusque 2.89 log_{10} copies/mL (Fabien Zoulim et al. 2020). Quelques inhibiteurs sont en phase pré-clinique, c'est le cas du GLP-26. Cet inhibiteur a récemment montré dans un modèle murin humanisé, une diminution de l'ordre de 4 log_{10} copies /mL en association avec l'Entecavir (Amblard et al. 2019). De façon générale peu d'effets secondaires ont été observés, malgré de rares cas d'élévation des transaminases qui ont conduit à l'arrêt du traitement (Asselah 2019; Viswanathan et al. 2020; Roca Suarez, Testoni, et Zoulim 2021).

Parmi les inhibiteurs les plus récents **de classe II**, le RO7049389 est actuellement en phase 2 et une étude récente chez 37 patients montre une diminution de jusque 3.33 log_{10} de copies/mL (M.-F. Yuen et al. 2021). Il est actuellement en essai en association avec des ARN interférents, des analogues nucléos(t)idiques, et des analogues du TLR7 (NCT04225715). Le GLS4 est également en essai clinique de phase 2. Ce dernier a montré une réduction allant jusque 2.13 log_{10} copies/mL en phase 1, et est actuellement en essai en association avec le Ritonavir. Le Ritonavir est un inhibiteur de la protéase du VIH et, de façon surprenante, permet d'augmenter la biodisponibilité du GLS4 et ainsi d'augmenter le taux plasmatique de l'inhibiteur (N. Zhao et al. 2019). Cette synergie aboutit jusqu'à présent à des réductions allant jusque 4.40log_{10} (NCT04147208).

	Composé	Etape de développement	Identifiant ClinicalTrials.gov
Classe I	NVR-3-778	Arrêt	NCT02401737
	ABI-H0731 (+ETV)	Phase 2	NCT04781647
	JNJ-6379 (+pegIFN)	Phase 2	NCT04667104
	GLP-26 (+ETV)	Pré-clinique	xxx
Classe II	RO7049389 (+TLR7/NUC/ARNsi)	Phase 1	NCT04225715
	GLS4 (+RTV)	Phase 2	NCT04147208

Figure 26 : Exemples d'inhibiteurs de types modulateurs allostériques de l'assemblage du VHB. Les inhibiteurs sont répartis en fonction de leur classe, leur nom, l'étape de développement et leur identifiant cliniques sont précisés. Leur utilisation en association avec d'autres composés est précisée dans la colonne composé. TLR7 = Analogue du Récepteur Toll-like 7 / NUC = Analogue nucléos(t)idique / ARNsi = Petits ARN interférents / RTV = Ritonavir / ETV = Entecavir / pegIFN = Interferon-α pégylé.

PROJET DE THESE

Objectifs de thèse :

La protéine core du virus HBV est essentielle pour la formation de la capside virale compétente pour la réplication. Cela explique qu'elle soit une cible privilégiée dans le cadre de la recherche de molécules permettant d'élargir l'arsenal thérapeutique actuel. Il est donc nécessaire de développer des efforts pour mieux comprendre le rôle d'HBc dans l'assemblage des particules d'HBV en milieu cellulaire et d'ouvrir ainsi la voie à des études permettant de caractériser les inhibiteurs du cycle viral. Les connaissances actuelles sur l'assemblage de la capside se basent principalement sur des études *in vitro* de protéine core produite en *E.coli*, purifiée, concentrée puis assemblée dans un milieu salin. Ces études ont mis en évidence que la partie N terminale était nécessaire et suffisante pour former une capside dans ces conditions. Cependant lorsque ces capsides sont produites en milieu physiologique, alors les études biochimiques ont montré que le CTD était lui aussi important pour l'assemblage des capsides. Le but de mon travail de thèse a donc été de suivre la morphogénèse de la capside d'HBV en milieu cellulaire en identifiant les domaines importants pour former des capsides ressemblant aux capsides issues de *sera* de patients et en localisant les domaines cellulaires abritant cet assemblage. Pour cela, nous avons utilisé la microscopie quantitative FLIM et FCS qui permettent de quantifier la formation d'oligomères d'HBc. D'autre part nous avons utilisé la microscopie électronique pour savoir si ces oligomères correspondaient à des capsides et pour déterminer l'ultrastructure cellulaire de ces assemblages. Durant ces études nous avons aussi cherché à connaître le rôle de l'ARN génomique lors de l'assemblage des particules virales. Une application de tous ces travaux a été de suivre l'effet des CpAMs des classes I et II sur l'assemblage d'HBc et sur son trafic intracellulaire.

Matériel et méthodes :

I. Constructions plasmidiques

Le plasmide pHBV1.1 (pCIHBpg1820seq) correspond au génome du VHB inséré 1.1 fois dans le pcDNA3, tandis que le pRVHBV1.5 correspond au génome inséré 1.5 fois. Ces plasmides codent donc pour toutes les protéines, incluant la core et la polymérase, et permettent la transcription de tous les transcrits viraux, incluant l'ARN pré-génomique. Le pHBcWT correspond au pCDNA3 dans lequel est inséré l'ORF C, codant pour la protéine core WT.

1. Construction des pHBV1.1ΔC

Le plasmide pHBV1.1ΔC correspond au plasmide pHBV1.1 dans lequel la protéine core a été délétée.

2. Construction du plasmide pHBV1.1MS2 et pHBV1.1ΔCMS2

La protéine MS2 correspond à la protéine de capside des bactériophages (MS2 Coat Protein). Cette protéine est capable d'interagir de manière spécifique avec des structures appelées tige-boucle MS2 de l'ARN du virus MS2. La technologie MS2 a ainsi été utilisée pour suivre l'ARN transcrit à partir de vecteurs contenant les tiges-boucles MS2 (Tutucci, Vera, et Singer 2018). La protéine MS2 a ainsi été taguée avec le rapporteur fluorescent eGFP et un signal de localisation nucléaire permet sa localisation nucléaire. Lorsque les transcrits tagués avec les tiges-boucles MS2 sont localisés dans le cytoplasme, la MS2-eGFP est exportée du noyau permettant ainsi la visualisation de l'ARN en microscopie.

Le plasmide pMS2-eGFP-NLS contenant la protéine MS2 dont la séquence est incluse dans un plasmide pcDNA3.1(+) via les enzymes de restriction NheI et HindIII nous a été donné par Emanuelle Querido et Pascal Chartrand (Querido et Chartrand 2008).

Les plasmides pHBV1.1MS2 et pHBV1.1ΔCMS2 ont été construits à partir des plasmides pHBV1.1 et pHBV1.1ΔC. Afin d'étudier uniquement l'interaction entre la protéine core, l'ARN pré-génomique et la polymérase, le codon d'initiation de la protéine X a été muté pour le rendre inactif en utilisant les amorces pCI1820delXatg_s et pCI1820delXatg_as. Le codon d'initiation de la polymérase a été muté pour le rendre inactif étant donné que les tiges boucles MS2 seront insérées dans cette région. Celui-ci est muté en utilisant le set d'amorce pCI1820delPOLatg_S et pCI1820delPOLatg_as pour le pHBV1.1, et le set d'amorce pCI1820DCdelPOLatg_S et pCI1820delPOLatg_as pour le pHBV1.1ΔC (Figure 27). Les mutations ont été faites avec le kit *Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit* (NEB). Nous avons inséré

12 tiges boucles MS2 dans la région 1585-3099. Ce choix permet de conserver l'ε mais également les PS1 et PS2 décrits par Patel et al. (Patel et al. 2017). Ensuite, les plasmides pHBV1.1X-Pol- et pHBV1.1ΔCX-Pol- ont été amplifiés par PCR à partir des amorces pCI18201585Rv_XhoI et pCI18203099Fw_EcorI (Figure 27) afin d'extraire la partie 1585 à 3099 du reste du plasmide en utilisant l'enzyme GoTaq Long PCR Master Mix (M4021, Promega). Ces amorces contiennent en leurs extrémités les sites de restriction XhoI et EcoR1. Le résultat de PCR a donc ensuite été digéré par les enzymes de restriction XhoI et EcoRI. En parallèle, les tiges-boucles MS2 ont été extraites du plasmide Luc_MS2_12X donné par Eric Piver (Prel et al. 2015) via les sites XhoI et EcoRI. Les résultats de la digestion du plasmide Luc_MS2_12X et des deux PCR sur le pHBV1.1X-Pol- pHBV1.1ΔCX-Pol- ont été mis à migrer sur gel d'agarose à 12% avant de purifier les bandes correspondant aux tiges-boucles et au backbone des plasmides amplifiés par PCR. Les bandes sont purifiées avec le kit *Gel and PCR clean-up* (Macherey-Nagel). Le fragment du Luc_MS2_12X contenant les 12 tiges boucles et les backbones des pHBV1.1 et pHBV1.1ΔC mutés sont alors ligués en utilisant la *T4 DNA Ligase* (NEB). Le résultat a été amplifié en bactéries *E.coli Stbl3* (Invitrogen) incubées à 30°C. Une dizaine de colonies ont été récupérées puis des mini-préparations ont été réalisées et purifiées via le kit *Nucleospin Plasmid* (Macherey Nagel). Les plasmides sont digérés par le site EcoRI et mis à migrer en gel d'agarose afin d'en vérifier la taille. Les résultats corrects de purification ont été séquencés et vérifiés avant d'amplifier les préparations correspondantes aux constructions désirées et de purifier les plasmides par maxi-préparation en utilisant le kit *Nucleobond Xtra Maxi* (Macherey Nagel).

3. Construction des mutants HBcY132A et HBcF97L.

Les mutants ont tous été obtenus à partir des plasmides pHBcWT, pHBc-eGFP et pHBc-mCherry. Les amorces référencées HBc_F97L_R et HBc_F97L_Fw ont été utilisées pour la mutation F97L et HBc_Y132A_F et HBc_Y132A_F pour la mutation Y132A (Figure 27). Les mutations sont faites par PCR ont été utilisées avec le kit Q5 *Site-Directed Mutagenesis Kit* (NEB). Des bactéries TOP10 ont été transformées avec le résultat de PCR avant de les incuber 24h à 37°C. Des mini-préparations ont été faites par le kit *Nucleospin Plasmid* (Macherey Nagel) à partir d'une dizaine de colonies par construction. Les plasmides sont digérés par le site EcoRI et mis à migrer en gel d'agarose afin d'en vérifier la taille. Les préparations correctes ont été séquencées et vérifiées avant amplification et purification par le kit *Nucleobond Xtra Maxi* (Macherey Nagel).

4. Construction des mutants HBc3A, HBc3E, HBc7A, HBc7E.

Ces mutants ont tous été faits à partir de plasmides pHBcWT, pHBc-eGFP et pHBc-mCherry. A cause de l'espacement entre les mutations à faire (3 ou 7 mutations par construction), nous avons commandé des séquences insérées dans des plasmides correspondant au domaine C-terminal d'HBc flanquées du site XbaI et ApaI présents dans le plasmide initial (Eurogentec). Les 7 résidus sérine thréonines sont dans ces plasmides mutés en alanine ou en acide glutamique pour les mutants 7A et 7E (S155, T160, S162, T168, S170 et S176), tandis que les sites majeurs de phosphorylations seuls sont mutés (S155, S162 et S170) pour les mutants 3A et 3E. Les plasmides vecteurs (pHBc) et les plasmides contenant les domaines C-terminaux mutés sont digérés par les enzymes XbaI et ApaI. Les deux digestions sont mises à migrer en gel d'agarose et les fragments correspondants au vecteur et au fragment muté sont purifiés en utilisant le kit *gel and PCR clean-up* (Macherey-Nagel). Les fragments sont alors ligués en utilisant la *T4 DNA Ligase* (NEB), puis des bactéries TOP10 sont transformées et incubées 24h à 37°C. Une dizaine de colonies par condition sont alors utilisées pour faire une mini-préparation et purifiées par le kit *Nucleospin Plasmid* (Macherey-Nagel). Les plasmides purifiés sont digérés par le site XbaI avant d'être séquencés et vérifiés. Les préparations correctes sont alors amplifiées et purifiés par le kit *Nucleobond Xtra Maxi* (Macherey-Nagel).

Nom	Séquence
pCI1820delPOLatg_S	GAC-CAC-CAA-ACG-CCC-CTA-TCC
pCI1820delPOLatg_as	TAT-AAG-CTG-GAG-GAG-TGC
pCI1820DCdelPOLatg_s	GTA-TGA-GAT-ACG-CCC-CTA-TCC
pCI1820DCdelPOLatg_as	TGA-AGG-AAA-GAA-GTC-AGA-AG
pCI1820delXatg_s	CAT-CGT-TTC-CTT-GGC-TGC-TAG
pCI1820delXatg_as	TAT-ATT-TGC-GGG-ATA-GGA-C
pCI18201585Rv_XhoI	GGT-GGT-CTC-GAG-TGG-TAA-CCT-TTG-GAT-AAA-ACC-TGG
pCI18203099Fw_Ecor1	GGT-GGT-GAA-TTC-TGT-GGG-TCT-TTT-GGG-TTT-TGC
HBc_F97L_R	CCA-TAT-TAG-TGT-TGA-CAT-AAC
HBc_F97L_Fw	GTT-TAA-AGT-TGA-GGC-AAC-TCT-TG
HBc_Y132A_F	TCC-TCC-AGC-TGC-TAG-GCC-TCC-G
HBc_Y132A_R	GTT-CTG-ATC-CAC-ACT-CCG

Figure 27 : Tableau récapitulatif des amorces utilisées.

II. Culture cellulaire

Les cellules HuH-7, HepG2 et HeLa sont maintenues en milieu de culture Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté et 1% d'un mélange d'antibiotique (100UI pénicilline, 100µg/mL

streptomycine, Invitrogen). La culture a lieu en laboratoire BSL2 et pour les conditions réplicatives en BSL3.

Pour le FLIM, $1{,}8.10^5$ cellules HuH-7 sont ensemencées en chambre de culture 4 puits sur lame (µ-Slide 4 well, IBIDI). Avant l'observation au microscope, le milieu est remplacé par du milieu L-15 de Leibovitz afin d'éviter la réfraction due au rouge de phénol.

Pour les expériences d'immunofluorescence et de smFISH, des lamelles de 12mm sont placées dans une plaque 12 puits avant d'ensemencer $1{,}8.10^5$ cellules HuH-7 ou $2{,}5.10^5$ cellules HepG2. Après 24, 48 ou 72h, les cellules sont fixées par 4% de paraformaldéhyde (Electron Microscopy Sciences) dans du PBS (Gibco).

Pour les expériences de western blot, 1.10^6 cellules sont ensemencées dans des boîtes de culture de type T25.

Les transfections sont faites en utilisant du jetPEI (Polyplus transfection) en suivant les instructions du fabricant. 1µg de plasmide par puit de P12 est préparé en tampons NaCl stérile, puis mélangé à 2µL de JetPEI, vortexé 30 secondes puis incubé 20 minutes. Le mélange est alors déposé goutte à goutte dans le puit correspondant. Le protocole est le même et dans les mêmes proportions, mais en transfectant 10µg par T25 ou 30µg par T75.

III. Western Blot

Les western blot sont effectués comme dans la publication jointe (Rat et al. 2020). Brièvement, les lysats sont dosés par dosage BCA avec le kit Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). 50µg de protéines sont dénaturés par l'utilisation de Laemmli (Bio Rad) et de 2-mercaptoethanol. Les protéines sont mises à miser en gel de SDS-PAGE 12%, puis transférés sur une membrane de nitrocellulose (Amersham). La membrane est ensuite saturée avec un tampon de saturation TBS/Tween 0,2% + 5% de BSA. La membrane est incubée avec un anticorps primaire en tampon de saturation sur la nuit à 4°C et lavée le lendemain par trois lavages de 10 minutes en TBS/Tween 0,5% (Anticorps anti-HBc purifié de sérum de patient (Roingeard et al. 1990) dilué au 1:5000, anti-GAPDH ab9485 dilué au 1:2000). La membrane est ensuite incubée avec un anticorps secondaire couplé à l'HRP pendant 1h à TA avant d'être lavée trois fois (Donkey anti-rabbit ab97064, Goat anti-human ab97225, dilués au 1:2000). L'HRP est révélée en utilisant de l'ECL (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Pierce ECL Western Blotting Substrate,Thermo Scientific).

IV. Hybridation *In Situ* en fluorescence.

Le FISH est une technique qui, par l'utilisation de sondes hybridées avec une molécule fluorescente, permet de détecter des ARN *In Cellulo*. Le processus de marquage des ARN par smFISH (single-molecule FISH) permet de détecter la cible nucléique par l'utilisation d'un set de 20 amorces. Le smFISH est fait en utilisant le protocole précédemment décrit (Unchwaniwala, Sherer, et Loeb 2016) et les sondes correspondent à la région 1987 à 2805 . Elles sont marquées à leur extrémité 3' par du Quasar 570 ou 670 (LGC Biosearch Technologies). Les cellules sont préparées et marquées selon les préconisations d'utilisation des réactifs *Stellaris RNA FISH* (LGC Biosearch Technologies). Brièvement, les cellules ont été fixées par 4% de paraformaldéhyde puis perméabilisées par 70% d'ethanol froid en smFISH simple ou 0,1% de Triton X-100 en smFISH associé à une immunofluorescence. Les lamelles sont alors incubées de 4h avec les sondes à 125nM puis lavées et montées avec du milieu de montage contenant du DAPI (Fluoromount-G, Mounting Medium, with DAPI, Invitrogen). Tout le processus de marquage des cellules est effectué en utilisant des réactifs RNAse-free.

L'immunofluorescence (IF) associée au smFISH a également été faite selon les préconisations du fabricant. Deux protocoles sont disponibles et les deux sont fonctionnels : un premier associant IF et smFISH simultanément, un second de façon séquentielle. L'anticorps primaire anti-HBc utilisé (Roingeard et al. 1990) est dilué au 1:2500, l'anticorps secondaire couplé à un Alexa 488 au 1:2000 (AB_2534080, Thermo Fischer Scientific).

Le témoin par la RNAse A est préparé avant le smFISH. Pour ceci, la RNAse A (RNAse A, DNase and protease-free (10mg/mL), Thermo Scientific) est préparée à 100µg/mL puis les lamelles sont mises en contact 1h à 37°C. La RNAse est ensuite inactivée par l'utilisation de SUPERase (SUPERase.In RNase Inhibitor, Invitrogen) à 1U/mL.

V. Microscopie électronique

La préparation et l'observation en microscopie électronique sont effectuées comme décris dans la publication jointe (Rat et al. 2020). Brièvement des cellules sont ensemencées et transfectées en T75 par un plasmide exprimant HBc ou un de ses dérivés et un plasmide exprimant HBc-eGFP ou un de ses dérivés. Les cellules sont alors récoltées et les cellules postitives pour la GFP sont triées avec un BD FACS Melody sur la plateforme BCR « B Cell Ressources » (Roxane Lemoine). Les cellules sont ensuite fixées par 4% de paraformaldéhyde et 0.05% de glutaraldéhyde pendant 1h à 4°C. Les culots ainsi obtenus sont incorporés dans de la gélatine puis infusés dans du sucrose (2.3M) sur la nuit. Des coupes ultra-fines (80nm) sont alors coupées à -110°C sur un cryo-ultramicrotome Leica Microsystems FC7. Les sections sont

récupérées dans un mélange de methylcellulose et de sucrose et collectées sur des grilles en nickel revêtues de carbone/formvar. La gélatine est ensuite retirée des grilles par chauffage à 37°C avant incubation avec un anticorps anti-GFP de lapin au 200ème (AB6556). Après lavages en PBS, les grilles sont incubées avec un anticorps de chèvre anti-lapin conjugué à des billes d'or de 10nm (Aurion). Les grilles sont lavées en PBS et en eau avant de les contraster en utilisant un mélange d'acétate d'uranyle 2% et de methylcellulose 2%. Elles sont ensuite observées sur un microscope électronique à transmission opérant à 100kV (JEOL 1011).

VI. Microscopie confocale, FLIM et FCS

Les immunofluorescences sont effectuées après fixation par 4% de formaldéhyde pendant 10 minutes. Les cellules sont incubées en tampon de perméabilisation et de saturation en triton 0,2% + BSA 0,4% pendant 30 minutes. Les cellules sont incubées avec les anticorps primaires dilués en PBS+BSA 0,4% pendant 1h à TA (Anti-HBc (Roingeard et al. 1990) au 1:2500, anti-LC3B ab48394, ABCAM au 1:500) puis avec les anticorps secondaires dilués au 1:2000 en PBS (Anti-human AB_2534080, Thermo Fischer Scientific, anti-Rabbit A11012). Les lamelles sont alors montées sur lame en utilisant du milieu de montage couplé à du DAPI (Fluoromount-G, Mounting Medium, with DAPI, Invitrogen), laissées à sécher à température ambiante sur la nuit et conservées à 4°C avant observation. L'observation a lieu sur un Leica SP8, en utilisant l'objectif 63x PL APO 1.40 CS2 Oil et un laser à lumière blanche pulsé (réglé à 488nm pour l'eGFP et l'Alexa 488, 594nm pour la mCherry et l'Alexa 594, 650nm pour le Quasar 670).

Les images FLIM ont été obtenues sur le même microscope grâce à l'application FALCON (FAst Lifetime CONtrast) ou au laboratoire « Microscopie de fluorescence quantitative » à l'IGDR – Rennes (Marc Tramier).

Le FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging) correspond à une mesure pixel par pixel de la valeur du temps de vie de fluorescence. Brièvement, une fois excitée la molécule va émettre un photon lors de son retour à l'équilibre. Le temps de ce déclin de fluorescence est appelé temps de vie de fluorescence et correspond donc au temps de retour de la molécule de l'état excité à l'état fondamental. Ce temps de vie varie de manière mono ou multi-exponentielle. C'est une donnée intrinsèque de chaque chromophore. Il est indépendant de la concentration mais est très sensible à son environnement (température, pH…) notamment de la présence d'un accepteur de fluorescence. En effet, la présence d'un accepteur peut entrainer un transfert d'énergie (FRET) et le temps de vie sera alors plus court. Le transfert d'énergie entre le donneur

et l'accepteur ne peut avoir lieu que lorsque les deux partenaires sont suffisamment proches : on parle de rayon de Förster. Le rayon de Förster est la distance entre le donneur et l'accepteur pour laquelle il y a 50% d'efficacité de FRET, donc un transfert d'énergie à 50% efficace. Ce rayon est d'environ 5 nm pour le couple eGFP et mCherry, distance qui traduit une interaction entre les partenaires (Albertazzi et al. 2009).

Dans nos travaux, nous avons utilisé comme donneur la eGFP dont le déclin mono-exponentiel donne un temps de vie de 2.2 à 2.4 ns et comme accepteur la mCherry. Les propriétés spectrales de ces deux molécules en font un couple très utilisé pour l'étude des interactions suivies par FRET. L'eGFP est excité à 488nm, et va émettre des photons entre 480 et 600nm. La mCherry est généralement excitée à 594nm, et sa fluorescence est émise entre 550 et 650nm. L'utilisation de ces partenaires permet l'étude des interactions entre les protéines par FLIM (Padilla-Parra et Tramier 2012).

Dans un premier temps, le FLIM est effectué sur les cellules qui expriment que le partenaire eGFP. Pour cela, les cellules transfectées dans une chambre de culture sur lame (µ-Slide 4 Well, Ibidi) sont mises en culture dans un milieu L-15 de Leibovitz puis placées sur la plateforme de microscopie possédant une chambre d'incubation. Le logiciel LAS X FLIM FCS intégré à LAS X nous permet de déterminer dans ces conditions le temps de vie moyen pixel par pixel de la protéine fluorescente. Cette valeur du temps de vie est ensuite utilisée pour reconstituer une image en utilisant une échelle de couleur arbitraire. Cette image donne donc une distribution dans la cellule de ces temps de vie. Puis les images FLIM sont effectuées sur les cellules qui expriment les deux partenaires marqués à l'eGFP et à la mCherry. Le temps de vie de l'eGFP en présence de mCherry est alors calculé et une image est reconstituée. Les temps de vie de l'eGFP seule ou en présence de mCherry permettent de calculer l'efficacité du transfert d'énergie avec l'équation : $E = 1 - \frac{\tau da}{\tau d}$ (Eq_1). Dans cette équation, E est l'efficacité de FRET, τd est le temps de vie du donneur seul et τda est le temps de vie du donneur en présence de l'accepteur.

La FCS, spectroscopie de corrélation de fluorescence, permet quant à elle de caractériser la diffusion de molécules fluorescentes par la mesure des fluctuations de l'intensité de fluorescence. Ces fluctuations, mesurées dans un petit volume confocal, sont directement dépendantes des mouvements browniens de diffusion des objets fluorescents qui rentrent et qui sortent du volume d'observation. Ces courbes de fluctuations sont analysées en calculant l'autocorrélation temporelle afin de déterminer le nombre moyen d'objet fluorescent dans le

volume et leur constante de diffusion. Il est aussi possible de déterminer l'histogramme de comptage de photons (PCH) pour analyser le nombre et la brillance des particules qui diffusent. Dans ce cas, l'histogramme de comptage des photons permet d'obtenir les valeurs de brillance q1 et q2 d'un monomère et d'un oligomère, respectivement. La valeur de q1 est mesurée sur des cellules transfectées par l'eGFP seule qui reste sous forme de monomères. La valeur q2, correspondant à la brillance des oligomères est mesurée dans nos cellules transfectées avec l'HBc-GFP, et à partir du q1 et du q2, nous pouvons également calculer le n1 et n2 qui correspondent à leur quantité respective. Ainsi, nous pouvons déduire le nombre de monomères et le nombre d'oligomères présents dans les cellules. Les cellules sont observées à 37°C sans être fixées et les mesures sont faites en sélectionnant plusieurs points dans les zones d'intérêts. 4 points par cellules sont sélectionnés et la fluctuation de la fluorescence est mesurée sur un Leica SP8 comprenant un module PicoQuant, et en utilisant un détecteur photodiode à avalanche en excitant à 488 nm et avec un filtre à l'émission entra 500 et 550 nm pour sélectionner la fluorescence de la GFP. Les données de fluctuation obtenues sont analysées sur le logiciel FFS Data Processor Software en utilisant le PCH et un modèle à deux espèces afin de permettre la résolution des paramètres q1, q2, n1 et n2.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Partie 1 : Assemblage de la capside du virus de l'Hépatite B

I. Etude des domaines essentiels pour l'assemblage du virus de l'Hépatite B

1. Introduction et présentation des résultats obtenus

La protéine core d'HBV est formée de trois domaines : le domaine N-terminal essentiel à la formation de la capside, le domaine C-terminal permettant son interaction avec la polymerase et l'encapsidation de l'ARN et le linker reliant les deux. HBc est capable de s'auto-assembler en dimère via ses hélices α3, puis va former des hexamères interagissant entre eux via le domaine 124-135 avant de former des capsides. Le domaine N-terminal seul est suffisant pour la formation de la capside *in vitro*. Ces modèles *in vitro* utilisent une protéine tronquée (1-149), exprimée en système procaryote (*E.* coli) puis purifiée et assemblée dans un milieu salin propice à l'assemblage (A. Zlotnick et al. 1996). Toutefois, en lysat the réticulocyte de lapin ainsi qu'en système de germe de blé, cette forme tronquée d'HBc (HBc-NTD) s'est révélée incapable de former des capsides (Ludgate et al. 2016; S. Wang et al. 2019). En cellules HepG2 et HuH-7, l'HBc-NTD ne semble également pas capable de former de capsides, néanmoins les protéines HBc-NTD ainsi exprimées par transfection de plasmides ne sont que très peu produites en HuH-7 (K. Liu et al. 2018). Notre étude s'est donc focalisée sur un aspect davantage cellulaire, en détaillant le rôle du domaine C-terminal (CTD), mais également des différents domaines responsables de la formation de la capside par des méthodes de microscopie.

Afin d'étudier l'oligomérisation d'HBc par microscopie de fluorescence quantitative, nous avons conçu des protéines HBc fusionnées à l'eGFP et à la mCherry. L'insertion de protéines dans l'épitope c/e1 a déjà été décrite comme n'impactant pas la formation de la capside (Kratz, Bottcher, et Nassal 1999; Yoo et al. 2012) Par conséquent, nous avons inséré dans cet épitope la protéine eGFP (ou mCherry) flanquée de linkers riches en glycine. Nous avons ensuite construit des plasmides codant pour les protéines contenant des délétions au niveau des résidus 51-71 correspondant à l'hélice α3 (HBcΔαH3), des résidus 124-135 (HBcΔ124-135) ou des résidus 150-183 correspondant au CTD (HBc-NTD) et leurs homologues fluorescents vert et rouge. La protéine HBc-NTD n'étant pas stable (Ludgate et al. 2016; K. Liu et al. 2018) nous avons eu l'idée d'insérer un tag HA dans l'épitope c/e1 et constaté son expression stable dans la cellule (Cf. Article ci-après, figure 1). Dans le reste du manuscrit, cette protéine sera tout de même appelée HBc-NTD. Nous avons vérifié que ces constructions

étaient exprimées à des poids attendus par western blot et présentaient des phénotypes similaires à la protéine sauvage par immunofluorescence ou observation des protéines fluorescentes en microscopie confocale (Cf. article ci-après).

Afin d'étudier l'oligomérisation des protéines, nous avons utilisé le FLIM qui nous permet de suivre le FRET qui a lieu entre l'eGFP et la mCherry insérés dans l'HBc. Brièvement, cette technique nous permet de déterminer le temps de vie du donneur (τ_d), l'eGFP, qui est représenté dans les cellules par une échelle de couleur arbitraire. Ce temps de vie peut diminuer en présence de l'accepteur, la mCherry, (τ_{da}) si les deux partenaires sont à une distance inférieure à 5 nm, traduisant une interaction (Cf. Partie Matériel et Méthodes) (Tramier et al. 2006). A partir de ces temps de vie, une efficacité de FRET est calculée grâce au rapport $\frac{\tau da}{\tau d}$, et permet d'évaluer l'efficacité du transfert d'énergie entre l'eGFP et la mCherry (Padilla-Parra et Tramier 2012).

A titre de contrôle, des cellules HuH-7 ont tout d'abord été transfectées avec le plasmide eGFP ou la protéine hybride eGFP-mCherry et analysées par FLIM (Figure 28). La protéine hybride eGFP-mCherry est utilisée afin d'estimer l'efficacité de FRET dans ce modèle. Le temps de vie de fluorescence de l'eGFP est de 2.5 ± 0.01 ns tandis que celui de la protéine chimérique eGFP-mCherry descend à 2.23 ± 0.04 ns. Cette diminution correspond à une efficacité de FRET de 11.7% ± 2%. Des images de FLIM sont construites en utilisant une échelle de couleur allant de 1 ns (orange) à 2.6 ns (rouge). Les cellules exprimant l'eGFP apparaissent alors en rouge tandis que les cellules exprimant l'eGFP-mCherry sont colorées en bleu (Figure 28 (a) et (b)). La distribution de ces couleurs pour les deux conditions est homogène dans la cellule.

Nous avons ensuite calculé le temps de vie de l'eGFP fusionnée avec l'HBc dans des cellules transfectées par une combinaison de plasmides exprimant l'HBc et l'HBc-eGFP (à un ratio de 0.7/0.3) à 24h post-transfection. Ce ratio est utilisé afin d'atténuer l'impact de l'eGFP sur l'assemblage (El Meshri et al. 2015; Richert et al. 2015; Maldonado et al. 2017). L'HBc-eGFP a un temps de vie de 2.06 ± 0.04 ns qui, comparé à l'eGFP seule, montre que celui-ci est modifié par la fusion avec l'HBc. Cette diminution pourrait être due à un mauvais repliement de l'eGFP. Les images correspondant à l'HBc-eGFP montrent donc des cellules bleu-foncées, et ce temps de vie et la couleur associée ne varient pas en fonction du temps ni de la mutation de délétion utilisée (Figure 28 (c), (g), (k) et (o)).

Nous avons alors transfecté les cellules avec un mélange de plasmides HBc/HBc-eGFP/HBc-mCherry (ratio 0.7/0.1/0.2) et le temps de vie de fluorescence dans ces cellules a été suivi à 24, 48 et 72h post-transfection. Pour la protéine sauvage, à 24h post-transfection le temps de vie est mesuré à 1.51 ± 0.03 ns et reste stable dans le temps, ce qui se traduit par des cellules vertes à jaunes (Figure 28 (d), (e) et (f)). L'efficacité de FRET a été calculée à partir de ces valeurs via l'équation décrite dans la partie matériel et méthodes et correspond à une moyenne de 28 à 30% à 24, 48 et 72h post-transfection (Figure 29 en jaune). Cette efficacité importante montre qu'HBc forme des oligomères très denses. Par ailleurs, cette efficacité ne change pas en fonction du temps suggérant que rapidement après sa synthèse la protéine HBc existe essentiellement sous forme d'oligomères.

Le CTD et la région 124-135 ont été étudiés de la même façon. Pour ces deux constructions le temps de vie reste à 2-2.1ns. Ceci aboutit à l'observation de cellules bleues (Figure 28 (h), (i) et (j) pour HBc-NTD et (p), (q) et (r) pour HBcΔαH3). Par conséquent l'efficacité de FRET de ces constructions est d'environ 5% pour l'HBc-NTD et 7% pour l'HBc-Δ(124–135) (Figure 29 respectivement en bleu foncé et cyan). Nous constatons aussi que cette faible efficacité ne change pas en fonction du temps donc de la concentration en protéine. Cela montre que ces mutants sont faiblement condensés et diffusent dans les cellules sous forme de monomères ou de dimères. Il est également possible que ces constructions aboutissent à la formation de structures incorrectes qui préviendraient la proximité entre les deux rapporteurs fluorescents.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la délétion de l'hélice 3 qui aboutit, à 24h post-transfection, à une diminution hétérogène du temps de vie moyen à 1.85 ± 0.15 ns avec deux populations de cellules colorées en bleu (non montrées) ou en vert à jaune (Figure 28 (l), (m) et (n)). Cette hétérogénéité se traduit par une efficacité de FRET allant de 0 à un FRET similaire à celui de la protéine sauvage à 24h. Nous remarquons que le temps de vie diminue davantage à 48 et 72h (1.5 ± 0.14ns) ce qui aboutit à un FRET statistiquement identique à la protéine sauvage (Figure 29 en vert). Ces données indiquent finalement que l'oligomérisation requiert les régions C-terminale et 124-135 de la protéine core tandis que la cinétique d'assemblage d'HBc dépend de l'hélice 3. De plus le temps de vie possède une distribution spatiale homogène, ce qui suggère que l'oligomérisation n'est pas restreinte à une région spécifique de la cellule.

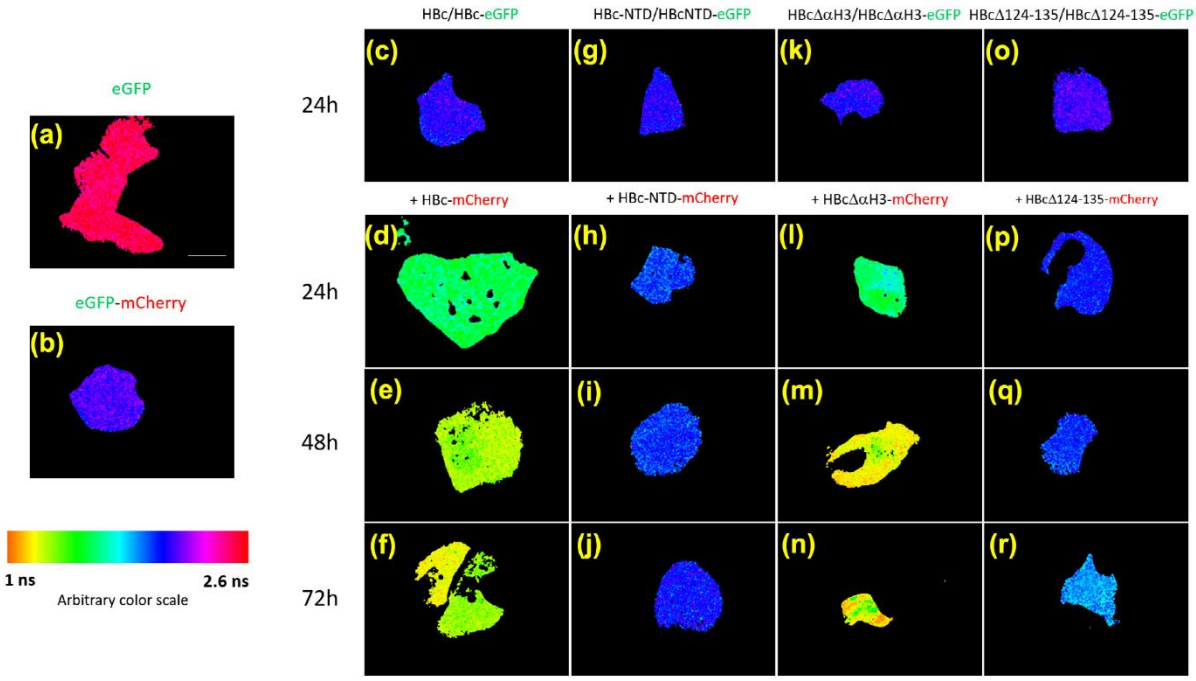


Figure 28 : Imagerie de l'oligomérisation d'HBc et des dérivés d'HBc. Images représentatives du temps de vie montrant la distribution des protéines HBc-eGFP (et des dérivés d'HBc-eGFP) exprimées en cellules HuH-7. Les cellules ont été transfectées avec un plasmide exprimant l'eGFP (a) ou la protéine chimérique eGFP-mCherry (b) ou un mélange d'HBc/HBc-eGFP (ratio 0.7/0.3) (c) associé avec l'HBc-mCherry (ratio 0.7/0.1/0.2) (d, e, f) ou un mélange d'HBc-NTD/HBc-NTD-eGFP (ratio 0.7/0.3) (g) associé avec l'HBc-NTD-mCherry (ratio 0.7/0.1/0.2) (h, i, j) ou un mélange d'HBc-ΔαH3/HBc-ΔαH3-eGFP (ratio 0.7/0.3) (k) associé avec l'HBc-ΔαH3-mCherry (ratio 0.7/0.1/0.2) (l, m, n) ou un mélange d'HBc-Δ124–135/HBc-Δ124–135-eGFP (ratio 0.7/0.3) (o) associé avec HBc-Δ124–135-mCherry (ratio 0.7/0.1/0.2) (p, q, r). Trois plaques 24 puits ont été préparées et incubées à 37°C pour 24, 48 ou 72h. Le temps de vie de fluorescence Ƭ de l'HBc-eGFP (ou des dérivés) a été mesuré en absence de la proteine acceptrice (image c, g, k et o) ou en présence des homologues mCherry et converti en couleur en utilisant une échelle de couleur allant de l'orange (1ns = court temps de vie de fluorescence) au rouge (2.6 = long temps de vie de fluorescence). Une barre d'échelle est représentée sur l'image a et représente 10µm.

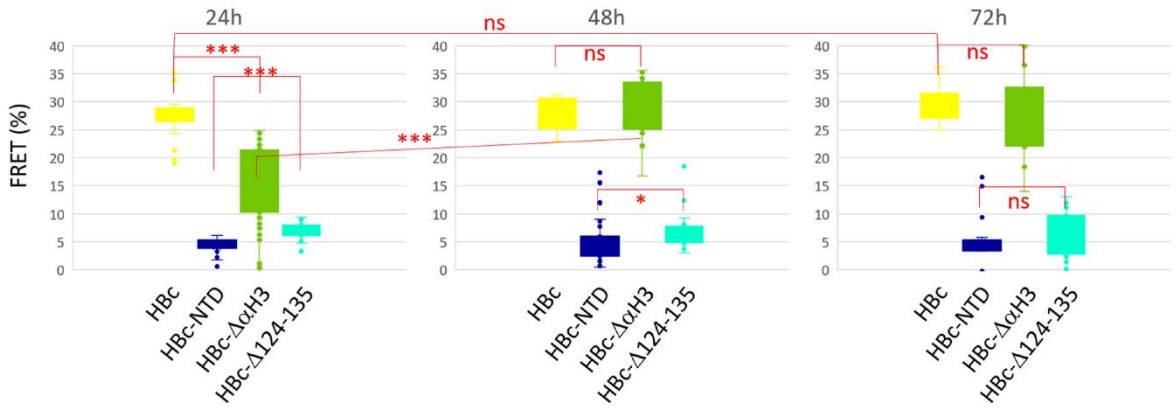


Figure 29 : Histogrammes des efficacités de FRET en fonction du temps post-transfection. Les graphiques en boîtes à moustache de l'efficacité de FRET (E) ont été déterminés à 24, 48 et 72h post-transfection. E a été calculé en utilisant l'équation Eq_1 référencée dans la partie matériel et méthodes. Des tests de student ont été faits pour comparer les efficacités de FRET. (ns : non spécifique ; *$p<0.05$; **$p<10^{-3}$).

Afin de mieux caractériser l'oligomérisation d'HBc, nous avons utilisé la FCS décrite dans le matériel et méthodes. Les fluctuations de fluorescences de l'eGFP ont été mesurées dans des cellules vivantes exprimant un mélange de 0.7µg d'HBc et 0.3µg d'HBc-eGFP pour la protéine sauvage et les mutants de délétion. Nous avons tout d'abord mesuré la variation de fluorescence en fonction du temps et observons des fluctuations avec de grandes amplitudes pour la protéine sauvage en comparaison avec les amplitudes moyennes des mutants HBc-NTD et HBc-Δ(124-135) (Figure 30, (a), (b), (d) graphique du haut). Ces grandes amplitudes correspondent à la formation de larges oligomères. Le mutant de délétion de l'hélice 3 présente quant à lui deux populations, une population de grande amplitude comme la protéine sauvage et une de faible amplitude comme les deux mutants précédents (Figure 30, (c) graphique du haut). Ce résultat est accord avec les données de FLIM qui montraient des cellules avec une efficacité de FRET importante ou inversement avec une faible efficacité.

Les approches utilisant l'autocorrélation permettent de mesurer le temps de résidence, relié à la diffusion des particules. Nous observons des temps de résidence élevés pour les oligomères précédemment décrits, et plus faibles pour les monomères (Figure 30, (a), (b), (c) et (d) graphique de gauche). Néanmoins l'autocorrélation ne nous a pas permis de caractériser l'oligomérisation d'HBc étant donné la présence de deux populations dans les cellules : une première constituée de monomères comprenant une seul eGFP et capable de diffuser rapidement (HBc en monomères/dimères) et une seconde constituée d'oligomères incluant plusieurs eGFP et diffusant plus lentement (formes intermédiaires/capsides). Par conséquent

nous utiliserons l'histogramme de comptage des photons (PCH) afin de mieux caractériser ces deux populations. La PCH permet d'étudier la brillance et la quantité de particules fluorescentes dans le volume confocal. Nous avons par conséquent pu distinguer les monomères (annotés 1) des oligomères (annotés 2) et déterminer respectivement les q1 et q2 correspondant à leur brillance, et les n1 et n2 correspondant à leur nombre. Nous avons pu définir avec ces paramètres la quantité d'oligomères dans les cellules et leur taille (Figure 30, (e) représentant la quantité d'oligomères, (f) représentant le nombre d'eGFP dans les oligomères observés). La protéine sauvage est retrouvée oligomérisée dans plus de 80% de nos mesures. Les oligomères présents possèdent une brillance d'en moyenne 26.4 fois l'eGFP, correspondant à des oligomères de 170 à 230 copies d'HBc/particules, ce qui se rapproche des capsides natives de symétrie T=3 (180 copies) et T=4 (240 copies) (Crowther 1994). Les mutants HBc-NTD et HBc-Δ(124-135) sont oligomérisés respectivement dans 15 et 9% de nos mesures et forment des petits oligomères d'une brillance équivalente à 6 eGFP. Le mutant HBc-ΔαH3 est quant à lui retrouvé sous forme oligomérisée dans 25% de nos mesures et ces oligomères sont comparables en taille à la protéine sauvage.

Nous avons finalement utilisé les paramètres q1, q2, n1 et n2 afin de définir la proportion d'eGFP impliquées dans des oligomères en fonction de la concentration (Figure 30, (f)). La proportion d'HBc-eGFP oligomérisées augmente rapidement en fonction de la concentration et nous pouvons définir un K_d apparent pour l'assemblage de la capside du VHB d'environ 0.7-0.8µM. Les mutants de délétion du CTD et de la région 124-135 montrent à nouveau une faible oligomérisation. En revanche la délétion de l'hélice 3 est située dans une situation intermédiaire avec la présence d'une population non oligomérisée et d'une population capable de s'oligomériser à plus haute concentration. Finalement ces résultats sont en corrélation avec les résultats de FLIM et montrent que l'efficacité de FRET élevée observée pour l'HBc sauvage et le mutant HBc-ΔαH3 correspond à des oligomères. Ils montrent également qu'un FRET faible correspond à des monomères ou à de petits oligomères, correspondant aux mutants HBc-Δ(124-135) et HBc-NTD.

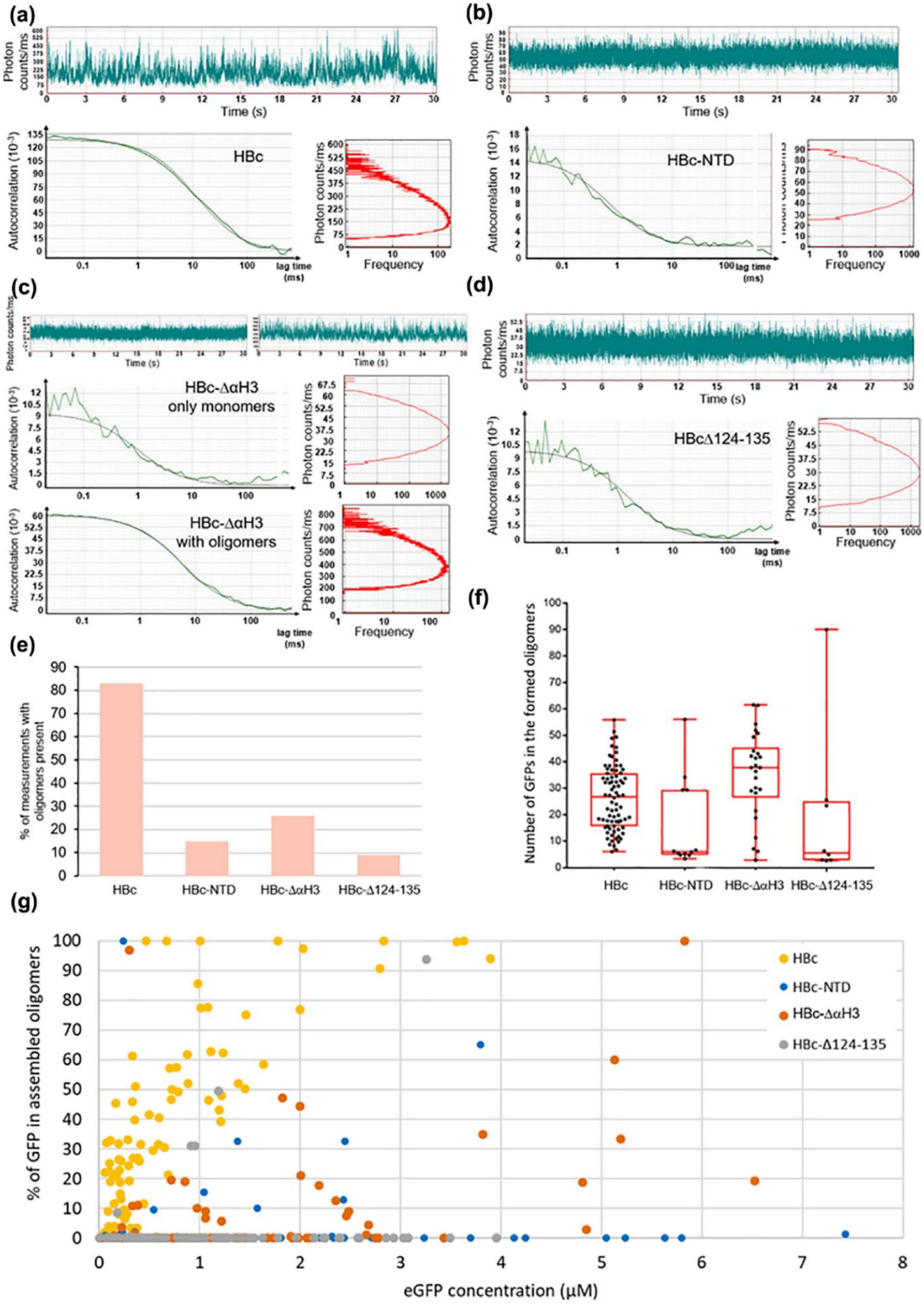


Figure 30 : Analyse de la formation des particules d'HBc ou des dérivés d'HBc par spectroscopie de corrélation de fluorescence. Représentations des mesures de fluctuation de

la fluorescence (a, b, c, d). Chaque panneau comprend un suivi temporel du comptage de photon sur 30s de mesure (haut), une courbe d'autocorrélation (gauche) et un histogramme de comptage des photons (droite) obtenus dans des cellules exprimant l'HBc/HBc-eGFP (ratio 0.7/0.3) (a), l'HBc-NTD/HBc-NTD-eGFP (0.7/0.3) (b), HBc-ΔαH3/HBc-ΔαH3-eGFP (0.7/0.3) (c), HBcΔ124–153/HBcΔ124–153-eGFP (0.7/0.3) (d). Proportion des mesures dans lesquelles la formation de particules oligomérisées a été observée (e). Diagramme en boîte montrant la distribution des mesures du nombre d'eGFP dans les particules observées (f). Distribution de la proportion d'eGFP trouvées dans des particules assemblées en fonction de la concentration en eGFP dans le volume confocal observé (g). Voir l'article associé pour plus de détails sur les calculs.

Nous avons ensuite voulu déterminer si les oligomères observés jusqu'à présent en utilisant le mélange HBc/HBc-eGFP correspondaient à des capsides. Nous avons donc transfecté des cellules HuH-7 avec des plasmides exprimant HBc/HBc-eGFP (0.7/0.3) puis les cellules ont été marquées par immunomarquage de l'eGFP avec un anticorps secondaire couplé à une bille d'or, dense aux électrons. Nous observons la présence de capsides à proximité de billes d'or pour la condition HBc sauvage, ce qui montre que l'utilisation du ratio 0.7/0.3 d'HBc/HBc-eGFP n'empêche pas la formation de capsides comparables à des capsides natives (Figure 31, (a)). Les cellules exprimant les mutants HBc-Δ(124-135) et HBc-NTD montrent la présence de billes d'or dispersées sans accumulation de billes en clusters (Figure 31, (b) et (c)). Enfin le mutant HBcΔαH3 montre la présence de clusters de billes sans la présence de capsides, et ce même à 72h post-transfection (Figure 43, (d)). Finalement seule la protéine sauvage est capable de former des capsides.

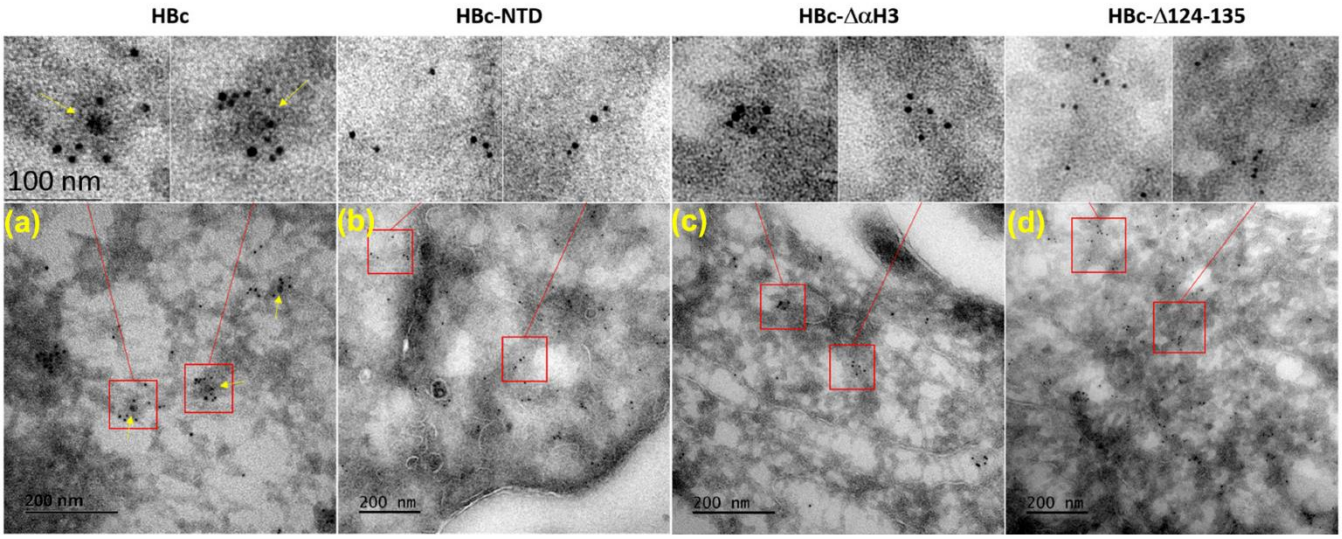
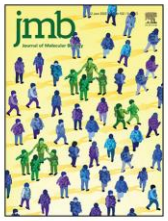


Figure 31 : Immunomarquage par des billes d'or d'HBc et des dérivés d'HBc observé en microscopie électronique. Des cellules HuH-7 ont été transfectées par un mélange de plasmides exprimant l'HBc (a) ou HBc-NTD (b) ou HBc-ΔαH3 (c) ou HBc-Δ124–135 (d) en présence de leurs homologues eGFP dans un ratio 0.7/0.3. Les cellules sont triées par l'eGFP et fixées avant inclusion en gélatine. Des sections ultrafines (70nm) sont coupées et incubées avec un anticorps anti-eGFP et lapin et un anticorps anti-lapin couplés à des billes d'or de 10nm. L'échelle est rapportée en bas à gauche. Les encarts présentent les différents clusters d'anticorps secondaires couplés aux billes d'or. Les capsides du VHB sont mises en évidence avec des flèches jaunes.

2. Manuscrit

Article



Hepatitis B Virus Core Protein Domains Essential for Viral Capsid Assembly in a Cellular Context

Virgile Rat[1,†], Xavier Pinson[5,†], Florian Seigneuret[1,†], Stéphanie Durand[1], Charline Herrscher[1], Roxane Lemoine[3], Julien Burlaud-Gaillard[2], Pierre-Yvan Raynal[2], Christophe Hourioux[1,2], Philippe Roingeard[1,2], Marc Tramier[4,5] and Hugues de Rocquigny[1,]

*1 - **INSERM U1259 MAVIVH,** Université de Tours and CHRU de Tours, 10 boulevard Tonnellé, BP 3223, 37032 Tours Cedex 1, France*
*2 - **Plate-Forme IBiSA des Microscopies,** PPFASB, Université de Tours and CHRU de Tours, 10 boulevard Tonnellé, BP 3223, 37032, Tours Cedex 1, – France*
*3 - **Plateforme B Cell Ressources,** EA4245 "Transplantation, Immunologie et Inflammation", Université de Tours, 10 Boulevard Tonnellé, 37032 Tours Cedex 1, France*
*4 - **Univ Rennes,** IGDR (Institute of Genetics and Development of Rennes)—UMR CNRS 6290, 2 Avenue du Professeur Léon Bernard, 35000, Rennes F-35000, France*
*5 - **Microscopy Rennes Imaging Centre,** SFR Biosit, UMS CNRS 3480—US INSERM 018, Université de Rennes, 2 Avenue du Professeur Léon Bernard, 35000 Rennes, France*

***Correspondence to Marc Tramier and Hugues de Rocquigny:** Univ Rennes, IGDR (Institute of Genetics and Development of Rennes)—UMR CNRS 6290, 2 Avenue du Professeur Léon Bernard, 35000, Rennes, F-35000, France. virgile.rat@etu.univ-tours.fr, xavier.pinson@univ-rennes1.fr, florian.seigneuret@univ-tours.fr, stephanie.durand@etu.univ-tours.fr, charline.herrscher@etu.univ-tours.fr, rlemoine@univ-tours.fr, julien.gaillard@univ-tours.fr, raynal@univ-tours.fr, christophe.hourioux@univ-tours.fr, philippe.roingeard@univ-tours.fr, marc.tramier@univ-rennes1.fr, hderocquigny@univ-tours.fr*
https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.04.026
Edited by M.F. Summers

Abstract

Hepatitis B virus (HBV) core protein (HBc) is essential to the formation of the HBV capsid. HBc contains two domains: the N-terminal domain corresponding to residues 1–140 essential to form the icosahedral shell and the C-terminal domain corresponding to a basic and phosphorylated peptide, and required for DNA replication. The role of these two domains for HBV capsid assembly was essentially studied *in vitro* with HBc purified from mammalian or non-mammalian cell lysates, but their respective role in living cells remains to be clarified. We therefore investigated the assembly of the HBV capsid in Huh7 cells by combining fluorescence lifetime imaging microscopy/Förster's resonance energy transfer, fluorescence correlation spectroscopy and transmission electron microscopy approaches. We found that wild-type HBc forms oligomers early after transfection and at a sub-micromolar concentration. These oligomers are homogeneously diffused throughout the cell. We quantified a stoichiometry ranging from ~170 to ~230 HBc proteins per oligomer, consistent with the visualization of eGFP-containingHBV capsid shaped as native capsid particles by transmission electron microscopy. In contrast, no assembly was observed when HBc–N-terminal domain was expressed. This highlights the essential role of the C-terminal domain to form capsid in mammalian cells. Deletion of either the third helix or of the 124–135 residues of HBc had a dramatic impact on the assembly of the HBV capsid, inducing the formation of mis-assembled oligomers and monomers, respectively. This study shows that our approach using fluorescent derivatives of HBc is an innovative method to investigate HBV capsid formation.

© 2020 Published by Elsevier Ltd.

Introduction

There are approximately 250 million people chronically infected with the hepatitis B virus (HBV) worldwide, and among them, nearly 900,000 die annually, primarily as a result of clinical complications such as cirrhosis and hepatocellular carcinoma [1]. HBV is a 42-nm diameter hepatotropic DNA virus, with an outer envelope made by lipid-embedded small (S), middle (M) and large (L) surface proteins sheltering a 30-nm diameter icosahedral capsid [2]. This capsid corresponds to the oligomerization of the core protein (HBc) and it is filled with a partially double stranded DNA referred to as "relaxed circular" DNA (rcDNA), originating from the reverse transcription of the pregenomicRNA (pgRNA) [3,4]. In addition to these so called DANE particles [5], various studies have shown that the secreted particles have a differential composition. They correspond either to subviral particles made only of envelope proteins, to empty particles or to particles containing pgRNA [6–8].

HBV capsid shell was studied using different production sources to demonstrate that HBc is sufficient for capsid assembly (Table 1). HBc contains 183 residues and is composed of two major domains (Figure 1(a)). The N-terminal domain (NTD) is constituted by residues 1–140 and is essential for the self-assembly of the particle *in vitro* [3] (Table 1). The C-terminal domain (CTD; residues 149–183) contains a series of four arginine-rich domains (ARD), and all the seven potent phosphoacceptor sites that are both essential for pgRNA encapsidation and DNA synthesis [9,18,21–23]. This domain was originally localized in the internal layer of the capsid, but it can also protrude at the surface. Its presence at the surface was shown to depend on the presence or the absence of RNA or DNA, and on its phosphorylation status [10,24–28]. Lastly, HBc contains a small and flexible spacer peptide (141–149), tethering the NTD and CTD domains and possibly regulating capsid assembly [29,30].

In addition to the formation of the capsid, a significant number of studies indicate that HBc has pleiotropic functions in HBV cycle. These functions include nucleic acid (NA) chaperone activity during reverse transcription [23,31], nuclear import of the genome [32] and the interaction with the covalently closed circular cccDNA [4]. Thus, the HBc protein represents a critical factor in virus replication, and a prominent target in developing strategies for new anti-viral molecules [33].

Details on the NTD structure were obtained by X-ray at a resolution of 3.3 Å [19] and by cryoEM [20,34–36]. More recently, the structure of HBc was entirely solved by cryoEM at a 2.6 to 2.8-Å resolution, and it showed that the structure of the NTD domain remains largely unchanged in the entire protein [10]. It forms icosahedral shells containing either 120 HBc dimers (T = 4 particles, 95%) or 90 HBc dimers (T = 3 particles, 5%), arranged in both cases with quasi-equivalence [20]. For T = 4, four similar conformations yield two conformers of HBc dimers, each one forming the characteristic four-helix bundles that appear as spikes on the surface of the capsid [18,19,37]. This four-helix bundle corresponds to the association of two α helices (H3 and H4) of each monomer. This interaction is mainly stabilized by an extensive amount of contacts between the H3 residues. These dimers are assembled in capsids *via* the multiple interactions of residues located in the fifth helical structure, the proline-rich loop (128–136), and the C-terminal arm [19].

The data pointing out the essential role of NTD in the formation of a capsid morphologically similar to capsids formed by a full-length HBc were carried out *in vitro*, using approaches as high salt concentration and proteins purified from *Escherichia coli* (Table 1) [3,20,38]. Nevertheless, the NTD alone failed to assemble properly when purified from rabbit reticulocyte lysates, suggesting that the CTD was also required [12]. Thus, the purpose of our study was to visualize the assembly of the HBV capsid in more relevant cells, and in physiological conditions. We therefore imaged HBc capsid assembly over time by combining fluorescence lifetime imaging microscopy–fluorescence resonance energy transfer (FLIM-FRET), fluorescent correlation spectroscopy (FCS) and transmission electron microscopy (TEM). These techniques were performed on human hepatoma cell lines Huh7 permissive for HBV replication [39] and transiently transfected by plasmid expressing HBc, together with HBc derivatives harboring a fluorescent reporter at position 79–81 (Figure 1(a)) [40–42]. FLIM-FRET and FCS analyses revealed that HBc/HBc-eGFP together with HBc-mCherry formed oligomers homogeneously distributed in the cell. Brightness analyses allowed to calculate

Table 1. HBc and HBc-NTD assembly from various organism

	E. coli	Rabbit reticulocyte lysate (RRL)	*Xenopus* oocytes	HepG2.117, HuH7,	Insect cells
HBc	+++ [9–11]	+++ [12]	+++ [13,14]	+++ [10,15,16]	+++ [17]
HBc-NTD	+++ [3,18–20]	– [12]	nd	nd	nd

+++ means assembly efficiency; – means assembly deficiency.

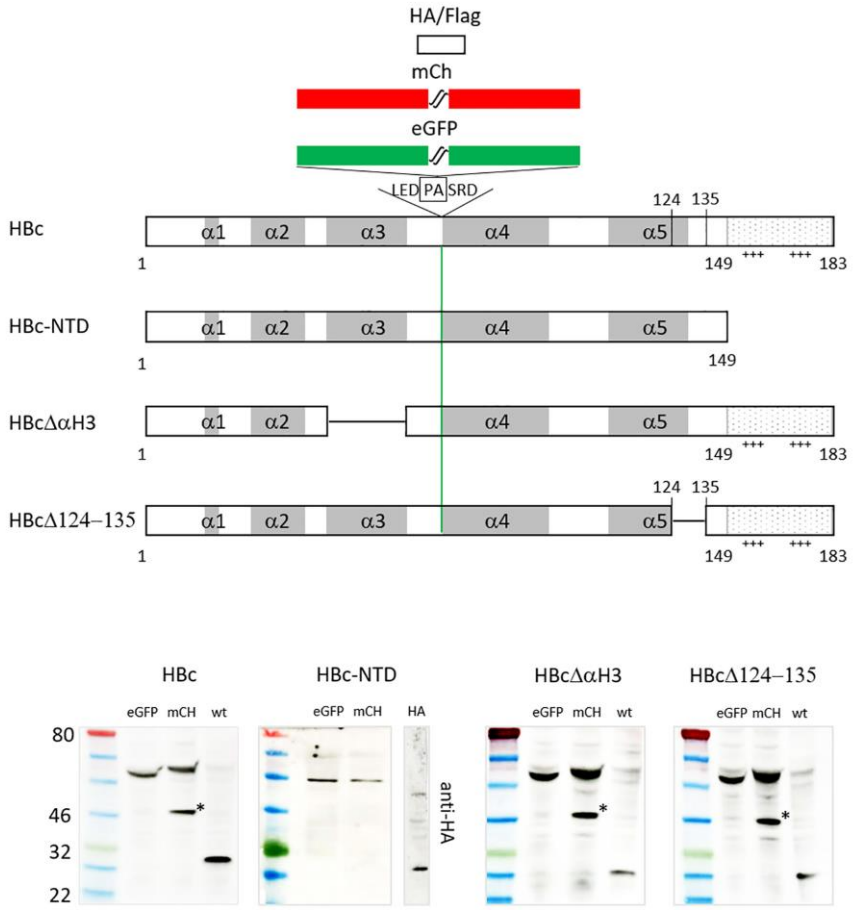


Figure 1. Scheme of HBc and HBc fusion constructs and Western blot analysis. (a) Schematic representation of HBc and HBc derivatives. Gray filled boxes correspond to NTD helical domains and dotted box to the CTD. HA/Flag tags or fluorescent reporters mCherry or eGFP were inserted in the positions 78 and 80. (b) Western blot analysis of HBc and HBc derivatives. Huh7 were transfected with a plasmid expressing HBc or HBc derivatives and harvested 24 h post-transfection. Proteins were heat denatured and loaded on a SDS-PAGE. HBc and HBc derivatives were revealed using anti-HBc antibody excepted for HBc-NTD-HA/Flag that was revealed with an anti-HA antibody. * corresponds to a partial hydrolysis of HBc-mCherry and HBc-mCherry derivatives.

the stoichiometry of HBc in oligomers and an apparent K_d. Using electron microscopy, we observed that these oligomers corresponded to capsid particles. We next used these approaches to detail which HBc sub-domains are required for its assembly in mammalian cell context. We discovered that HBc-NTD fails to self-assemble, suggesting that the CTD is essential for the formation of wild-type capsids in a mammalian cell context. The third helix found essential for monomer-monomer interaction was removed in HBcΔαH3, and this deletion gave rise to monomeric HBc or misassembled aggregates. At least, the ^{124}VWIRTPPAYRPP^{135} sequence required for dimer oligomerization was deleted and HBcΔ124–135 proteins were found diffusing mainly as monomers. Together, our results show that our microscopy methods can be used to track the

assembly of the HBV capsid in a cellular context. This opens the way to the possibility of following the assembly of the HBV capsid during the replication cycle, and the effect of assembly inhibitors such as capsid assembly modulator (CAMs) on the viral capsid structure.

Results

Rational design of HBc and HBc fluorescent proteins to monitor HBc oligomerization

In order to study HBc oligomerization by quantitative fluorescent microscopy, we designed HBc proteins fused to eGFP and mCherry. To this end, several strategies have already been described [43,44], and the insertion of antigens in the c/e1 epitope was shown to poorly impact the capsid formation [45,46]. Indeed, an eGFP protein (or a monomeric mCherry) flanked by glycine-rich linkers was inserted between residues 78 and 80 of HBc and electron microscopy revealed the formation of capsid-like particles of HBc149-eGFP, with surface-exposed eGFP domains [40,42,47,48].

The plasmids encoding unlabeled and labeled HBc were constructed as described in the Materials and Methods section. Western blot analyses of HBc, HBc-eGFP and HBc-mCherry using an anti-HBc antibody revealed the expression of each protein at the expected molecular weight (Figure 1(b), panel 1). Next, we constructed plasmids coding for proteins deleted either from residues 51–71 and encompassing the third helix (HBcΔαH3), or from ^{124}VWIRTPPAYRPP^{135} (HBcΔ124–135) [19]. We then analyzed the expression of HBcΔαH3 (Figure 1(b), panel 3) and HBcΔ124–135 (Figure 1(b), panel 4) and their respective fluorescent counterparts, and found that these proteins localized at their expected molecular weights. However, an additional band was observed for all mCherry derivatives, potentially suggesting a partial hydrolysis of these chimeric proteins.

Using the same strategy, we constructed plasmids expressing HBc-NTD, HBc-NTD-eGFP and HBc-NTD-mCherry. The two fluorescent proteins were detected at their expected molecular weights using an anti-HBc antibody (Figure 1 (b), panel 2), in contrast to non-fluorescentNTD that was undetectable by Western blot and by immunofluorescence (data not shown) and in agreement with recent reports [12,49]. Given that the anti-HBc antibody detected HBc-NTD-eGFP (Figure 1(b)), we hypothesized that the insertion of a sequence in the c/e1 epitope could stabilize HBc-NTD. Hence, a HA/Flag tag was inserted in the apical loop of HBc, allowing the detection of HBc-NTD-HA/Flag with an anti-HA antibody (Figure 1(b)). We now refer to HBc-NTD-HA/Flag as HBc-NTD for the rest of the manuscript.

Co-localization between HBc (or HBc derivatives) with their fluorescent counterpart

To verify the influence of eGFP on the cellular distribution of HBc and HBc derivatives, Huh7 cells were first transiently transfected for 24 h with a plasmid expressing unlabeled HBc or truncated HBc proteins. After fixation, cells were incubated with a human anti-HBc antibody, then with a fluorescent anti-human antibody coupled to Alexa 585 and finally observed by confocal microscopy (Figure 2, upper panels).Wild-type HBc and truncated HBc were diffusing the all cell and predominantly in the nucleus for HBc, HBc-ΔαH3 and HBc-Δ124–135 (Figure 2(a)–(d)), in agreement with the localization of HBc when it is expressed alone [50,51]. We next transfected Huh7 cells with a combination of plasmids expressing unlabeled and eGFP-labeled HBc derivatives (Figure 2, lower panels). This combination of plasmids contained 0.7 μg of plasmid coding for unlabeled HBc and 0.3 μg of plasmid coding for eGFP-labeled HBc, to attenuate the impact of eGFP on HBc assembly according to a previously reported strategy [43,52,53]. Nuclei were stained with DAPI, and proteins were localized through the eGFP fluorescence. As shown in the lower panels of Figure 2, cells that expressed HBc with HBc-eGFP, and all HBc derivatives together with their fluorescent counterparts accumulated predominantly in the nucleus, along with a diffused fluorescence in the cytoplasm. Note that the distribution of HBc-eGFP (Figure 2(c)) was in contrast with the pattern observed in an earlier report using an assembly-incompetent fluorescent HBc with a tandem-repeat of eGFP at the N terminus of core protein [43]. All together, these results show that the cellular localization of HBc or HBc truncated proteins is similar with or without eGFP, suggesting the limited impact of eGFP on the cellular distribution of HBc.

Imaging HBc oligomerization monitored by FLIM in cells

To follow HBc oligomerization, we used the FLIM method to monitor FRET between eGFP and mCherry-labeled HBc [54]. These two fluorescent proteins are commonly used as a donor/acceptor pair to monitor protein/protein interactions by FLIM-basedFRET [55,56]. The donor eGFP has a high quantum yield (0.8) and a mono-exponential time-resolved fluorescence decay [57]. The acceptor mCherry has an absorption spectrum that overlaps the fluorescence spectrum of eGFP, giving a large Förster R_0 distance (where the transfer efficiency is 50%) of about 54 Å [58]. In FLIM-basedFRET, the donor lifetime varies based on the surrounding nanoenvironment, and it can be measured pixel per pixel. The

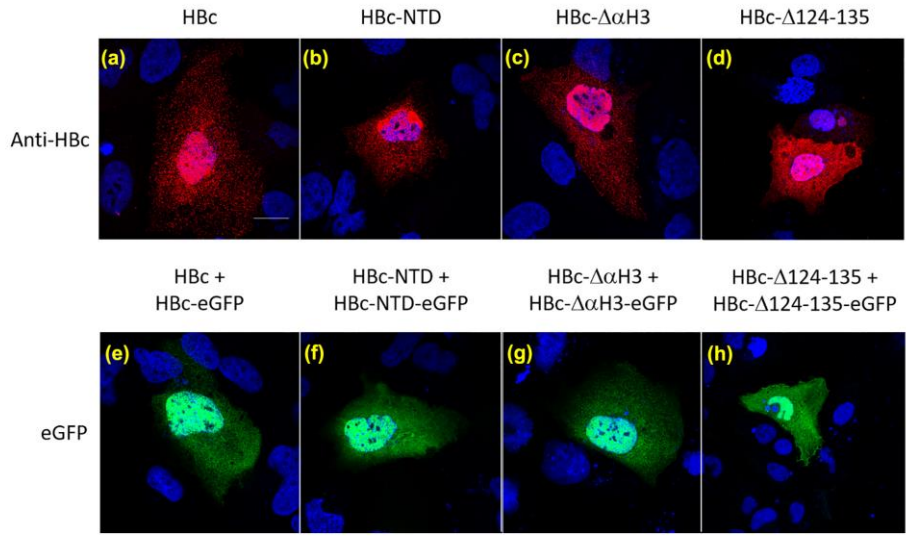


Figure 2. Cellular localization of HBc, HBc derivatives and their fluorescent counterparts. Upper row: Huh7 was transfected with 1 μg of plasmid expressing HBc or HBc derivatives: (a) HBc, (b) HBc-NTD, (c) HBc-ΔαH3 and (d) HBc-Δ124–135. Cells were fixed and immunostained with a human anti-HBc antibody detected with Alexa 585 goat anti-human. The last washing was carried out with DAPI. Lower row: Huh7 was transfected with 1 μg of plasmid expressing HBc or HBc derivatives together with their eGFP counterpart (ratio 0.7/0.3): (e) HBc and HBc-eGFP, (f) HBc-NTD and HBc-eGFP-NTD, (g) HBc-ΔαH3 and HBc-eGFP-ΔαH3, (h) HBc-Δ124–135 and HBc-eGFP-Δ124–135. Cells were fixed and stained with DAPI. Each image corresponds to the superimposition of the blue channel and the green channel. These images show the major observed phenotype from 5 to 10 cells of three independent experiments. Scale bar in white represents 10 μm.

presence of an acceptor in the immediate vicinity of the donor fluorophore allows a transfer of energy between donor and acceptor, shortening the fluorescence lifetime of the donor eGFP. The FLIM technique determines the fluorescence lifetime (τ) of the donor, and τ values can be imaged using a pseudocolor scale.

First, Huh7 cells were transfected with a plasmid expressing eGFP or the tandem eGFP-mCherry, and analyzed 24 h post-transfection. The use of a fluorescent tandem was used to estimate the FRET efficiency in this cellular model. The fluorescence lifetime of eGFP was 2.5 ± 0.01 ns, while the fluorescence lifetime of eGFP tethered to mCherry dropped to 2.23 ± 0.04 ns. Using Eq. (1) described in the Materials and Methods section, this drop in τ corresponded to a FRET efficiency of 11.7% ± 2%, in agreement with an earlier report [59]. FLIM images were built using an arbitrary color scale ranging from 1 ns (orange) to 2.6 ns (red). Cells expressing eGFP (τ = 2.5 ± 0.01 ns) appeared then in blue (Figure 3(a)), and cells expressing the eGFP-mCherry tandem (τ = 2.23 ± 0.04 ns) appeared in red (Figure 3(b)). The color was homogeneously distributed throughout the cell, in agreement with the diffused localization of these reporter proteins [60]. FLIM analyses of cells expressing eGFP and eGFP-mCherry was also carried out at 48–72 h post-transfection, without significant modifications of eGFP τ (data not shown).

We next calculated the fluorescence lifetime of eGFP fused to HBc in cells transfected by a combination of plasmids expressing HBc/HBc-eGFP (ratio 0.7/0.3) at 24 h post-transfection. When compared to eGFP alone, eGFP lifetime was lowered in the presence of HBc (2.06 ± 0.04 ns) (Figure 3(c)). Image rendering of this drop corresponded to a pseudocolored dark blue cell (compare Figure 3(a) and (c)), showing that eGFP lifetime was modified by its fusion to the HBc protein. This control was also performed at 48 and 72 h, without any significant modification in the lifetime of HBc-eGFP at this timepoints (data not shown). HBc-eGFP lifetime values at 48 and 72 h were used to calculate the FRET efficiency as function of time post-transfection (Figure 4). Compared to eGFP

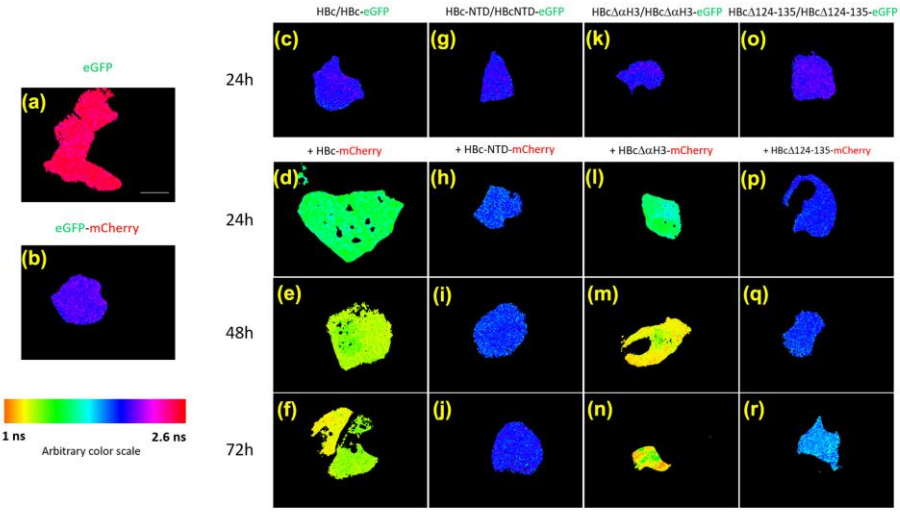


Figure 3. Imaging the oligomerization of HBc and HBc derivatives. Representative lifetime images showing the distribution of HBc-eGFP (and HBc-eGFP derivatives) proteins expressed in Huh7 cells. Cells were transfected by a plasmid expressing eGFP (a) or the chimeric eGFP-mCherry protein (b) or a mixture of HBc/HBc-eGFP (ratio 0.7/0.3) (c) together with HBc-mCherry (ratio 0.7/0.1/0.2) (d, e, f) or a mixture of HBc-NTD/HBc-eGFP-NTD (ratio 0.7/0.3) (g) together with HBc-NTD-mCherry (ratio, 0.7/0.1/0.2) (h, i, j) or a mixture of HBc-ΔαH3/HBc-ΔαH3-eGFP (ratio 0.7/0.3) (k) together with HBc-ΔαH3-mCherry (ratio 0.7/0.1/0.2) (l, m, n) or a mixture of HBc-Δ124–135/HBc-Δ124–135-eGFP (ratio 0.7/0.3) (o) together with HBc-Δ124–135-mCherry (ratio 0.7/0.1/0.2) (p, q, r). Three 24-well plates were prepared with 810^5 cells/well, incubated 37 °C for 24, 48 or 72 h. Then, DMEM medium was substituted for phenol red-free Leibovitz's L-15 medium supplemented with 20% FBS and observed in thermostatic chamber. The fluorescence lifetime τ of HBc-eGFP (or HBc-eGFP derivatives) was measured in the absence of the acceptor protein (images c, g, k and o) or in the presence of their mCherry counter parts and converted into color using a color scale ranging from orange (1 ns = short fluorescence lifetime) to red (2.6 ns = long fluorescence lifetime). A scale bar in white is reported image a and represents 10 μm.

alone, the shorter lifetime of eGFP when fused to HBc could originate from a misfolded eGFP protein. This was further suggested by the twofold decrease of the extinction coefficient calculated on Core 1–149 containing an internal eGFP [40].

Then, cells transfected by a mixture of plasmids expressing HBc/HBc-eGFP/HBc-mCherry (ratio, 0.7/0.1/0.2) were imaged at 24, 48 and 72 h post-transfection to monitor HBc oligomerization in function of time. At 24 h post-transfection, the eGFP mean lifetime dropped to 1.51 ± 0.03 ns and remained stable over time (1.46 ± 0.04 ns at 48 h and 1.41 ± 0.05 ns at 72 h) giving rise to cells pseudocolored yellow (Figure 3(d)–(f)). Using Eq. 1, we calculated an average FRET efficiency of 28 to 30% at 24, 48 and 72 h (Figure 4, yellow rectangles). This strong FRET efficiency showed that HBc molecules are closely packed, allowing a close proximity between the eGFP and mCherry tags. The absence of FRET variation in function of time suggested that HBc oligomers were probably formed along or just after the translation process.

The impact of the HBc CTD on the assembly of HBc was assessed using the same strategy. As mentioned above, the absence of unlabeled HBc-NTD expression [49] prompted us to analyze cells expressing a mixture of HBc-NTD containing an HA/Flag tags together with the HBc-NTD-eGFP and HBc-NTD-mCherry counterparts. In cells expressing HBc-NTD/HBc-NTD-eGFP (ratio 0.7/0.3), the eGFP mean lifetime was of 2.14 ± 0.01 ns (Figure 3 (g)), and the co-expression of these proteins with HBc-NTD-mCherry gave a mean τ equal to 2.05 ± 0.03 ns. Consistent with this slight decrease of τ, cells were pseudocolored in dark blue (Figure 3(h)). This weak variation of lifetime was not dependent on the time of protein expression, as the eGFP mean lifetime calculated at 48 and 72 h post-transfection were of 2.03 ± 0.04 and 2.12 ± 0.05 ns, respectively, thus leading to cells pseudocolored in light blue (Figure 3(i) and (j)) and a FRET efficiency of ~3–5% (Figure 4, dark blue boxes). This low FRET efficiency indicated that HBc-NTD proteins weakly condense, but they could diffuse as monomers/

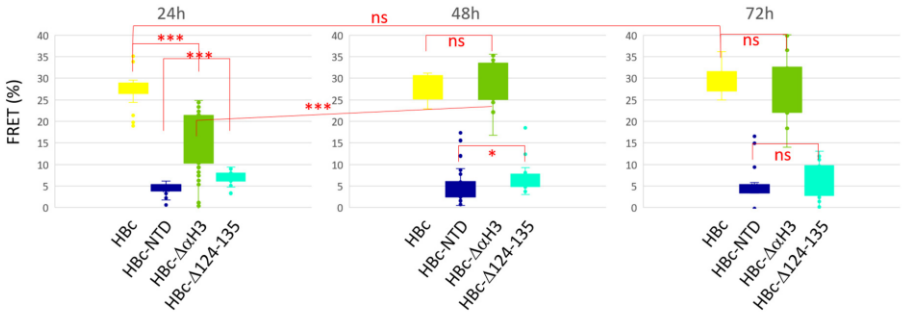


Figure 4. Histograms of FRET efficiency as function of time post-transfection. Box and whiskers plots of the FRET efficiency (*E*) was determined at 24, 48 and 72 h post-transfection. *E* was calculated using Eq. (1), where τ_{DA} is the lifetime of the donor in the presence of the acceptor and τ_D is the lifetime of the donor in the absence of the acceptor. Of note, τ_D used in the equation was determined for each HBc derivatives and at time of FLIM analysis (24 h, 48 and 72 h). Student tests were performed to compare the FRET efficiencies for at least 150 cells in three independent (ns: not specific; $^*p < .05$; $^{***}p < 10^{-3}$).

dimers in Huh7 cells. Alternatively, they could oligomerize in a non-canonicalpseudo-capsid shell, avoiding the close proximity between the two fluorescent reporters.

We then investigated the role of HBc structure on the oligomerization of the protein. Helix 3 was described as a long helical hairpin involved in the dimerization of each HBc monomer, and with the (124–135) stretch consisting on the bottom of the fifth helix and the following proline-rich sequence in interaction between dimer subunits [19]. Deletion of the third helix showed a heterogenous decrease of the mean lifetime at 24 h post-transfection (1.85 ± 0.15 ns) with two populations of cells, pseudocolored blue (not shown) and green (Figure 3(l)). This heterogeneity of τ was translated in a large FRET distribution ranging from 0 to a FRET similar to the wild-typeFRET level (Figure 4, green box). Interestingly, HBc-ΔαH3-eGFP lifetime decreased to 1.5 ± 0.14 ns as function of time post-transfection, leading to cells pseudocolored orange/yellow (Figure 3 (m) and (n)). After 72 h post-transfection, τ was not statistically different from the lifetime obtained with wild-type HBc (Figure 4, green bars). These results indicated a compaction of HBc-ΔαH3 oligomers with time, and/or an increase in the oligomer size so that the number of acceptor molecules in close proximity of each donor molecule would increases.

The deletion of (124–135) peptide had a more profound effect on HBc oligomerization since τ remained stable at 2–2.1 ns, leading to cells pseudocolored blue (Figure 3(p)). In contrast to HBc-ΔαH3, the time of protein expression up to 72 h had only a slight effect on HBc-Δ(124–135)-eGFP lifetime with apparition of cells pseudocolored light blue (Figure 3(q) and (r)) without a clear increase of the FRET mean efficiency (Figure 4, light blue boxes).

Taken together, our data indicate that HBc forms oligomers in the cytoplasm and the nucleus. The homogeneous spatio-temporal distribution of τ suggests that HBc oligomerization is neither restricted to a specific cytoplasmic domain nor to the time of expression (i.e. protein concentration). This oligomerization requires both the C terminus and the (124–135) sequence, while the kinetics of HBc oligomerization depends on the third helix.

HBc oligomerization monitored by Photo Counting Histogram analysis

To further characterize the oligomerization of HBc, FCS was performed on cell expressing HBc or HBc derivatives together with their fluorescent counterparts. This technique relies on the measurements of the intensity fluctuations of fluorescent species within a femtoliter volume to determine their physical parameters—diffusion time, local concentration and molecular brightness, which are related to their hydrodynamic and photophysical properties [61].

Fluorescence fluctuation measurements of eGFP fluorescence were acquired in the confocal volume during 30 s in live cells expressing HBc, HBc-NTD, HBcΔαH3 or HBcΔ124–135, together with their fluorescent counterparts. As mentioned for FLIM, the ratio of unlabeled to labeled plasmid was 0.7/0.3 to avoid the steric hindrance of the labeled eGFP during the core particle formation. Representative time traces of the photon counts were presented in Figure 5(a)–(d) for each condition. Measurements with wild-type HBc showed fluctuations with a much larger amplitude relative to the mean than with the HBc-NTD or the HBcΔ124–135 proteins (compare upper panels of Figure 5(a) with Figure 5(b) and (d)). This was in agreement with the expected presence for HBc of

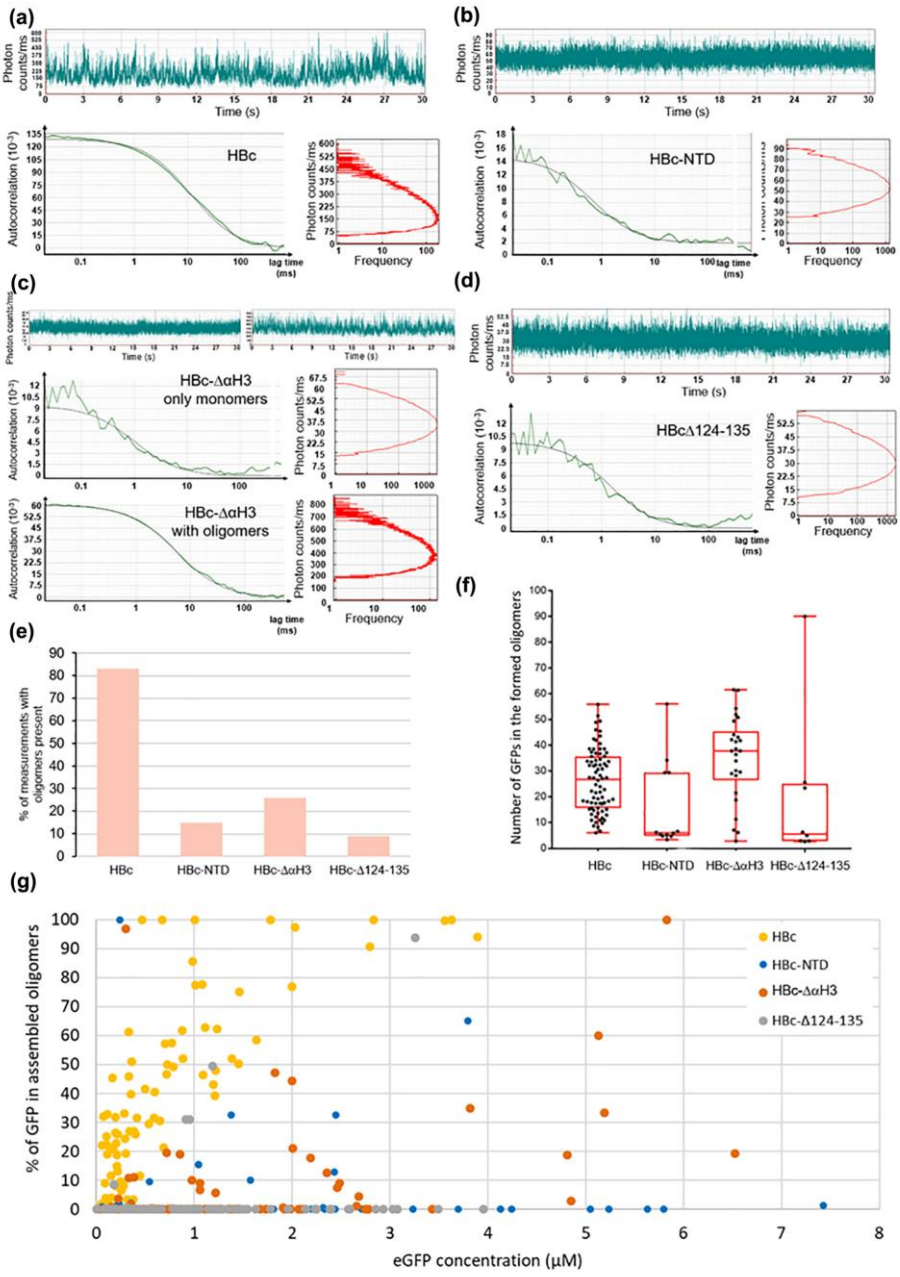


Figure 5 (*legend on next page*)

oligomers as bigger and brighter particles going in and out the confocal volume, and causing larger fluctuations. In the case of HBcΔαH3, two different fluctuations were observed, potentially indicating the presence of either oligomers or monomers (Figure 5 (c)). A conventional autocorrelation curve obtained after the temporal auto-convolution of this time trace was also presented with a typical single species Brownian motion fit. Independently of the different measurements, fits of the autocorrelation curves always exhibited a single species model. This was also true for potentially mixed populations of monomers and oligomers (see Figure 5(c)). The approach using autocorrelation analyses thus presented contrasted results with fluorescent proteins either diffusing with a fast residence time (around 300 µs, Figure 5 (d)–(d)), characteristic of what was found for the monomeric eGFP expressed in live cells [62], or diffusing with a residence time more than 10-time longer (around 10 ms Figure 5(a) and (c)), representative of eGFP oligomerized into a constituted core oligomer. With this analytic approach, we did not succeed in characterizing a mixed population with a double species model after fitting. This is directly related to the way of HBc forms particles, with a potential mixture of fast diffusing monomers having the single eGFP brightness and of slow diffusing oligomers, and with eGFP more than 10-fold brighter.

To finely analyze the formation of core particle oligomers from monomers, we decided to turn to the Photon Counting Histogram method (PCH) [63]. PCH gives access to the brightness of a fluorescent species and the number of fluorescent particles in the detection volume. In contrast with conventional autocorrelation that distinguish species with different diffusion times, the PCH approach allows to distinguish species of different brightness value. Thus, it is a very powerful method when the molecular mixture to analyze is constituted of species with different brightness. Experimental PCH curves were directly obtained from the time trace and plotted in Figure 5(a)–(d) (red curves). Contrary to the autocorrelation curves, the analysis of these PCH curves allowed to distinguish monomers from oligomers, thereby opening up the possibility of quantifying the ratio between monomers and oligomers in the living cell. All FCS measurements (three measurements per cell, n = 86–105 for each condition) were analyzed by PCH with a two species model: the monomeric species (freely diffusing HBc monomer) with a fixed brightness value *q1* (the brightness obtained with a control measurement on cells expressing monomeric eGFP) and *n1*, which is the mean number of monomers diffusing in the observation volume. Accordingly, the oligomeric species were given a brightness value *q2* and *n2* being the mean number of oligomers diffusing in the observation volume. For some analyzed PCH,*n2* was found close or equal to zero, which corresponds to the absence of oligomeric particles. For each cell analyzed, we then determined if oligomers were present ($n2 \neq 0$) or absent ($n2 = 0$). Figure 5(e) represents the percentage of measurements where the oligomers were present for each condition. When measurements were performed in cells expressing wild-type HBc, oligomers were found in 83% of the cases. On the contrary, the presence of oligomers in cells expressing HBc-NTD or HBcΔ124–135 was found in 15% and 9.2% of the cases, respectively. An intermediate situation was observed for HBcΔαH3, where oligomers were found present in 25.7% of measurements.

When oligomers were present, we are able to determine the size of these oligomeric particles through the quantification of their brightness. We calculated the number of labeled eGFP proteins in the oligomer by calculating the *q2*/*q1* ratio (see Materials and Methods for details) (Figure 5(f)). For wild-type HBc, the median value was 26.4, meaning that the brightness of an assembled core particle is 26.4 times the brightness of monomers (Figure 5(f)). The brightness of the larger species is thus 25–30 times that of the smaller one, assuming that the smaller species is a single-labeled dimer HBc/HBc-eGFP. Previous studies showed that in HBc-NTD-eGFP capsids only about 40–50% of the labeled proteins were fluorescent, thus this brightness should correspond to about 50–70 HBc-eGFP [40]. Further considering the excess of unlabeled to labeled protein resulting from the plasmid ratio (0.7/0.3) used for transfection, the larger species should correspond to an oligomer of 170–230 copies of HBc. This experimental value is in the range of the 180 to 240 copies of HBc protein for T = 4 or T = 3 triangular organizations [36]. Interestingly, the median value for HBcΔαH3 was similar to the value obtained for HBc (Figure 5(f))

Figure 5. Analysis of HBc or HBc derivatives particle formation through fluorescence fluctuation spectroscopy. (a–b–c–d) Single representative measurements of fluorescence fluctuation. Each panel comprises the time trace of the photon counts over the 30 s of the measurement (top), the autocorrelation curve (left) and the photon counting histogram (right) obtained on cells expressing. (a) HBc-HBc-eGFP (ratio 7/3); (b) HBc-NTD-HBc-NTD-eGFP(7/3); (c): HBc-ΔαH3-HBc-ΔαH3-eGFP (7/3); (d): HBcΔ124–153-HBcΔ124–153-eGFP(7/3). (e) Proportion of measurements where the formation of oligomeric particles was observed. (f) Box-plot showing the distribution of the measurements of the number of eGFPs in the observed particles (*q2*/*q1*, see Materials and Methods for details about the calculations). Top and bottom line: first and third quartiles respectively. Middle line: median value. Whiskers: minimum and maximum values. (g) Distribution of the proportion of eGFP found in assembled particles over the concentration of eGFP in the observed confocal volume. See Materials and Methods for calculation details.

showing that the HBcΔαH3 oligomers present in 25.7% of the measurements (Figure 5(e)) contained the same range of fluorescent proteins as the wild-type. In contrast, for both HBc-NTD and HBcΔ124–135, the median value of *q2*/*q1* ratio was 6.2 and 6.3, respectively. In the few measurements where oligomers were observed (Figure 5(e)), this demonstrates that both mutants generally originated smaller oligomers.

It is believed that HBc first dimerizes, and then it assembles in capsid in the cytoplasm (ref). Unfortunately, with our experimental setup, we were not able to determine if the non-oligomeric form of HBc would be monomeric or dimeric. Indeed, our experimental procedure was to transfect 30% of labeled HBc with 70% of unlabeled ones. If dimers are formed, a large majority would have single-labeled eGFP, indistinguishable from monomers as all exhibited the same brightness.

We finally used the brightness to measure protein binding curve inside the living cell. To this end, we plotted the percentage of eGFP molecules in assembled particles (Eq. 2) as a function of the total concentration of eGFP-fused proteins expressed in the measured cell (Eq. 3) (Figure 5(g)). For cells expressing wild-type HBc (Figure 5(g); yellow dots), most of the measurements showed that this protein was essentially in an oligomeric form, and this even at low protein concentrations. The amount of wild-type HBc for which 50% of the eGFP species were engaged in oligomers was about 0.7–0.8 μM, suggesting that the HBc capsid assembly was obtained at a sub-micromolar concentration. Conversely, in the case of cells expressing HBc-NTD or HBcΔ124–135 (Figure 5 (g), blue and gray dots, respectively), the vast majority of measurements showed the presence of the sole monomeric species, showing that these HBc mutants did not form oligomers. Consistent with the results shown on Figure 5(e) and (f), HBcΔαH3 (Figure 5(g), orange dots) displayed an intermediate situation, with measurements reflecting the presence of both monomeric and oligomeric species, suggesting that this protein retains the ability to form assembled particles at higher proteins concentrations.

Taken together, our FCS data are consistent with our FLIM-FRET experiments. On one hand, high FRET efficiencies obtained for HBc and HBcΔαH3 correspond to the formation of larger oligomers. On the other hand, the low FRET efficiencies obtained for HBc-NTD and HBcΔ124–135 corresponds to the formation of monomers or smaller oligomers. Moreover, we determined that a sub-micro molar concentration of wild-type core protein was sufficient for capsid assembly in living cells. Last, brightness measurements indicate that the larger HBc oligomers are capsid-sized.

Organization of HBc aggregates in cellular context viewed by immuno-electron microscopy

We then sought to determine if the mixture of HBc or HBc derivatives with their fluorescent counterparts were oligomerized in wild-type capsid particles. Cells were transfected with a plasmid expressing HBc together with a plasmid expressing HBc-eGFP (ratio 0.7/0.3), consistently with the conditions used for FLIM-FRET and FCS. After 24 h of protein expression, cells were sorted by FACS and pellets

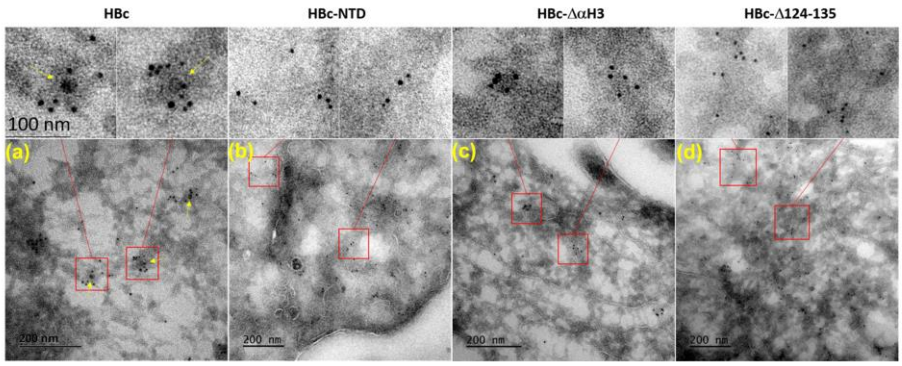


Figure 6. Immunogold labeling of HBc and HBc derivatives by cryo-electron microscopy (Tokuyasu method). Huh7 were transiently transfected by a mixture of DNA plasmid expressing HBc (a) or HBc-NTD (b) or HBc-ΔαH3 (c) or HBc-Δ124–135 (d) together with their eGFP counterpart in a ratio 0.7/0.3. Cells were sorted by monitoring eGFP and fixed prior to gelatin inclusion. Ultrathin sections were cut (70 nm) and incubated first with rabbit anti-eGFP antibody and then with 10-nm size gold-conjugated anti-rabbit antibody. Scale is reported at the bottom left. Insets present various clusters of gold-conjugated goat anti-rabbit. HBV capsids are highlighted by yellow arrows.

were processed for immuno-TEM with a primary anti-eGFP antibody. In cells expressing HBc/HBc-eGFP, we observed 10-nm gold beads, corresponding to the secondary antibody, surrounding a small, spherical and electron dense material (yellow arrows), and its size corresponded to the dimensions of a native capsid (Figure 6(a), enlargements and Figure S1). The distance between the central core and the gold beads corresponded to the dimensions of the primary-secondary antibody pair. These findings indicate that eGFP-labeled HBc was incorporated in HBV capsids in cells. Conversely, cells expressing either HBc-NTD (Figure 6(b)) or HBcΔ124–135 (Figure 6(d)) showed gold beads dispersed throughout the cell, without a notable accumulation into clusters. Finally, regarding the deletion of the third helix with HBc-ΔαH3, we observed clusters of gold beads without the presence of a dense central core (Figure 6(c)). Since Figures 3 and 4 showed an increased FRET efficiency as a function of time post-transfection for this construct, immuno-TEM was repeated at 72 h. However, we did not observe the formation of capsids at this time point (data not shown). Overall, these results provide evidence that only eGFP-labeled HBc forms native-like particles.

Discussion

Within the cell, the degree of HBc oligomerization was never studied. In this work, we investigated HBV capsid assembly in Huh7 hepatoma mammalian cells by combining FLIM-FRET, FCS and TEM. Combination of modern imaging techniques had previously been used to image the assembly of HTLV,RSV or HIV and to quantify the interaction between viral and cellular partners [52,53,64–71]. These approaches provided data that revolutionized our knowledge of the dynamic and structural changes involved during viruses infectious cycle [72–75] as well as in other fields of biology [76].

By using fluorescent protein tags, we show here that HBc/HBc-eGFP forms capsids in Huh7 cells similarly to wild-type capsids (Figures 6 and S1). The FRET efficiency of HBc-eGFP found in our experiments remained similar 24, 48 and 72 h post-transfection. This suggests that the core oligomerization happens shortly after expression and that the oligomers are not more condensed when the protein concentration increases (Figure 3(d)–(f)). This oligomerization observed without major structural changes along the time is consistent with the homogeneous distribution of the particle size found by FCS data (Figure 5(f)). The average brightness of 26.4 times the brightness of a single eGFP corresponds to an average number of HBc per oligomer between 170 and 230 (considering the expression of dark HBc). This average number fits with the quantity of 180 or 240 of HBc units (depending on the T = 4 or T = 3 icosahedral symmetry) found in HBV capsid structure [19,36].

Next, we used brightness analysis of FCS measurements that allows to discriminate monomers from oligomers to measure the assembly binding curve and to determine an apparent K_d for HBV capsid assembly of 0.7–0.8 μM (Figure 5(g)). Interestingly, brightness to measure protein–protein interaction inside living cells was already used to calculate the self-association of nuclear receptors with an apparent K_d of a few μM [77]. Similarly, the concentration of HTLV Gag and HIV Gag forming particles in living cells determined by brightness analysis was ~0.5 μM [78], with a stoichiometry for HIV ranging 750 to 2500 copies of protein per particle. This is in agreement with the larger size of HIV virus compared to HBV [79]. All these results illustrate that the brightness analysis provides details of molecular complexes in cells that would be difficult to obtain with other techniques.

In this work, a high level of HBc was imaged in the nucleus (Figure 2) in contrast to HBc staining in replicative cells [50]. In our condition of HBc expressed alone in Huh7 mammalian cells, HBc-CTD is phosphorylated and HBV capsid free of host nucleic acid with a partial exposure of HBc-CTD on the exterior of the capsid [10,24–26,80–82]. In turn, the NLS comprised in the CTD is available to drive HBc nuclear import [83,84] and, together with a nonspecific, but high affinity of HBc-CTD for double-stranded DNAs [21], to favor HBc accumulation in the nucleus. Our results also show that capsids containing a mixture of unlabeled and labeled HBc form are properly organized and sized (Figure 6(a)) like HBV capsids observed in cells replicating HBV (Figure S1). HBc assembly is so independent from other viral factors or from the maturation of the capsid during the reverse transcription of the pgRNA. In addition, we found by FRET that wild-type HBc efficiently oligomerize (Figures 4 and 5A and (e)) and oligomers are homogeneously distributed within the entire cell (Figure 3). This result shows that the assembly of HBV capsid is not restricted to a cellular sub-compartment, as described for herpes viruses in the nuclear compartment [85] or retroviruses at the plasma membrane [86]. Moreover, no significant difference in FRET efficiency or FCS measurements was observed in the nucleus as compared to the cytoplasm, despite the fact that a structural reorganization of the capsid was proposed for it to enter the nucleus [87]. In fact, in our experiments, the HBc protein was expressed alone, and as a consequence, potential structural reorganizations mediated by HBV maturation or its nuclear entry were not properly occurring [87]. Furthermore, it was proposed that the nuclear import of HBc oligomers is different from the nuclear import of viral particles competent for replication [43].

In contrast to the wild-type HBc, a low FRET efficiency was observed in cell expressing HBc-NTD

indicating a weak, if any, formation of HBc-NTD oligomers (Figures 3 and 4). The low FRET was not due to a reorganization of oligomers with a larger distance between donor and acceptor, since HBc-NTD was indeed essentially observed as monomeric protein by FCS (Figure 5(e)–(g)). This impairment of HBc-NTD to assemble was also confirmed by the absence of spherical, ordered complexes by TEM (Figure 6(b)). This low FRET efficiency (Figure 4) and brightness (Figure 5(f)) for HBc-NTD were constant for all the post-transfection timepoints analyzed, so that the lack of HBc-NTD oligomerization was not rescued by a higher concentration of protein. Indeed, no HBc-NTD oligomerization was found, even with up to 6–7 μM of HBc-NTD labeled protein (Figure 5(g)). Interestingly, labeled HBc-NTD produced in millimolar concentrations in *E. coli* is able to form such capsids [40,42]. Nevertheless, in the more physiological conditions, we used in this work no capsid was detected with labeled HBc-NTD, emphasizing the essential role of the CTD in HBV capsid morphogenesis.

The inefficiency of HBc-NTD to form HBc capsid when purified from a rabbit reticulocyte mammalian cells lysates had previously been reported by the group of Hu *et al.* [12]. Our analysis using quantitative methods confirms and extends this observation. How to explain this important difference between HBc and HBc-NTD assembly in a cell context? It is possible that the absence of HBc-NTD capsid assembly in our condition results from the low concentration of expressed protein, since purified HBc-NTD was shown *in vitro* to assemble with a $K_{d\text{apparent}}$ of 15 μM at 0.15 M of NaCl. Alternatively, HBc-NTD assembly cannot take place in cellular conditions due to the lack of CTD. It has long been suspected that the C terminus facilitates the formation of the native shell capsid, probably *via* specific or nonspecific interactions with RNA [12,18,88]. Nevertheless, as aforementioned when HBc is expressed alone in Huh7 mammalian cells, the CTD is phosphorylated and HBV capsid frees of host nucleic acid [10,80,82]. Therefore, it is likely that the differences observed between HBc and HBc-NTD are due to a defect in protein–protein interactions mediated by electrostatic interactions, as recently proposed by the group of Nassal [10] and by the use of CTD phosphomimetic 7E mutant [12]. Moreover, it is known that the CTD interacts with the SRPK protein, and it was proposed that, in addition to participating to CTD phosphorylation, SRPK could act as a potent protein chaperone that facilitates HBV capsid assembly [24]. The fact that a viral protein can hijack the cellular chaperone machinery during morphogenesis has been shown for other plant or animal viruses [89].

To further confirm that the quantitative fluorescent microscopy measurements on HBc-eGFP expressed in live cells is an efficient tool to study HBc assembly, we deleted two different domains of the protein to follow its effect on the assembly of the core particle. The third helix, together with the fourth helix, belongs to the α-helical hairpin protruding at the surface of the capsid. HBc dimers are stabilized through close contacts between helix 3 of each monomer, but not with helix 4 [19,90]. When the third helix was removed, we unexpectedly found a high FRET efficiency and the formation of large oligomers. Both FRET efficiency (Figures 3 and 4) and FCS analyses (Figure 5(c) (f)) were sensitive to the concentration of HBc-ΔαH3 proteins. FRET efficiency at 72 h post-transfection is similar to the FRET efficiency of the wild-type protein, except for its distribution exhibiting a large standard deviation and suggesting heterogeneous oligomers. In agreement with this heterogeneity, fluorescent particles with fast or slow diffusion coefficients were observed (Figure 5(c)). Despite these results, we never observed any capsid structure in TEM, but only the clustering of gold beads (Figure 6(c)) up to 72 h post-transfection (data not shown). This ability of HBc-ΔαH3 to oligomerize, although a non-canonical structure (Figure 6(c)), could be explained by the presence of ^{124}VWIRTPPAYRPP^{135} domain, since its deletion in the HBcΔ124–135 constructs has a dramatic impact on HBc oligomerization (Figures 3–6). This sequence contains the end of the fifth helix and the proline-rich loop essential for dimer–dimer interactions [19]. Mutations of R127 to L or Q were shown to clearly affect the *in vitro* assembly of HBc-NTD expressed from *E. coli* [90].

In conclusion, the knowledge gained in these studies provides novel insights to describe the spatio-temporal behavior of the HBc protein. FRET and FCS allowed to follow the assembly of HBc, while TEM allowed the observation of HBV capsids. We found that HBV assembly occurs efficiently at a low protein concentration, regardless of its cellular localization. The loss of the C terminus is detrimental to such assembly and is not rescued by raising the protein concentration. These results are important for the analysis of processes involved in HBc oligomerization such as phosphorylation [8], or the role of host proteins acting as chaperones and regulating the assembly of this viral capsid [24]. Furthermore, these studies could be used to detail the dynamics of CAMs-mediated capsid assembly inhibition and to follow the ultrastructure behavior of these complexes.

Materials and Methods

Plasmid DNA

The pTURF plasmids encoding for HBc and HBc-NTD, subtype ayw, fused to eGFP (also referred below to as fluorescent protein (FP)) was kindly provided by M. Nassal [40]. FP is surrounded by flexible glycine

linkers and inserted in the c/e1 epitope. This internal fusion was shown to be well tolerated with the formation of core particles [36,41,91–93]. HBc-eGFP was introduced in pcDNA3.1 by PCR, and this plasmid was used for the construction of unlabeled HBc and HBc-mCherry. These three plasmids were then used to generate HBc-NTD-HA/Flag, HBc-ΔαH3, HBc-Δ124–135 and their fluorescent counterparts. Primers used for amplification are summarized in Supplemental Table 1. The integrity of all plasmid constructs was assessed by DNA sequencing.

Cell culture and plasmid DNA transfection

Huh7 (differentiated hepatocyte-derived carcinoma cell line) were cultured in Dulbecco's modified eagle medium supplemented with 10% fetal calf serum (DMEM + GlutaMAX, Gibco, Lifetech, France) and 1% of an antibiotic mixture (penicillin/streptomycin: Invitrogen Corporation, Pontoise, France) at 37 °C in a 5% CO_2 atmosphere. Huh7 cells were transfected or co-transfected using jetPEI™ (Life Technologies, Saint Aubin, France) according to the supplier's recommendations. To keep a constant amount of transfected DNA, each transfection assay was supplemented with $pcDNA_3$.

Western blot

Twenty-four hours post-transfection, Huh7 cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS 1×: 140 mM NaCl, 8 mM NaH_2PO_4, 2 mM Na_2HPO_4), treated with trypsin and resuspended in ice-cold lysis buffer (1% Triton X-100, 100 mM NaF, 10 mM NaPPi, 1 mM Na3VO4 in PBS supplemented with a complete anti-protease cocktail from Roche, Meylan, France). After centrifugation, total protein concentration was assessed by Bradford analysis (Bio-Rad), and 30 µg of total protein was loaded on a 12% SDS-PAGE. Proteins were then transferred onto PDVF membrane (Amersham, Orsay, France), and blots were probed with a human anti-HBc polyclonal anti-body (dilution 1:5000) [94] or with anti-HA antibody (AB18181, dilution 1:2000) followed by horseradish peroxidase conjugated rat anti-human (Southern Biotech, dilution 1:20000) or rat anti-mouse (Southern Biotech, dilution 1:10000), revealed by chemiluminescent ECL Prime system on a Imagequant LAS500 apparatus (GE Healthcare).

Confocal microscopy

Huh7 cells (8×10^{4}) were transfected in 6-well plates containing 12-mm coverslips with 1 µg a DNA containing plasmids expressing for HBc (or HBc derivatives) alone or containing a mixture of plasmid expressing for HBc (or HBc derivatives) and HBc-eGFP (or HBc-eGFP derivatives) in a ratio 0.7/0.3 to mimic conditions used for FLIM experiments. Cells expressing unlabeled proteins were washed in 1× PBS 24 h post-transfection, fixed by 4% of PFA and permeabilized with 0.2% triton/PBS. Then, cells were blocked for 30 min with 0.4% of BSA in 1× PBS, incubated with a human polyclonal anti-HBc (diluted 1:2500, [94]) and after successive washings, with Alexa 594 goat anti human (ThermoFisher scientific). DNA was stained with DAPI(2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamidine dihydrochloride, SIGMA) (1 mg/ml, 1:10000). Cell expressing unlabeled and labeled proteins were fixed by 4% of PFA, permeabilized with 0.2% triton/PBS and washed DAPI containing 1× PBS. Fluorescence confocal images were acquired using LEICA SP8 gSTED confocal microscope equipped with 63× (NA = 1.40). Excitation light was provided with laser diode at 405 nm for DAPI, an argon laser at 488 nm for Alexa 488 and white light laser at 594 nm for Alexa 594.

Cell sorting using FACS

Huh7 cells (10×10^{6}) plated in a T75 flask and transfected with 10 µg of plasmid expressing HBc were treated with trypsin and resuspended in ice-cold complete medium (DMEM, 10% fetal bovine serum (FBS)). Cells were then sorted by using the BD FACS Melody and gating was done using the BD FACS Chorus™ software (BD Biosciences). Cell sorting was performed with 100-µm nozzle size and sorted directly into 1.5-ml tubes containing complete medium to minimize cellular stress. After establishing the basic gating parameters, GFP positive cells (1×10^{5} to 8×10^{5}) of each population of interest were sorted at a speed of 6000 cells/s.

Immunogold labeling of cryosections: immunoelectron microscopy

Cells expressing HBc/HBc-eGFP for 24 h were sorted and fixed for 2 h with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (pH 7.6), washed twice with PBS (pH 7.6) and included in gelatin (12%). Infusion with sucrose (2.3 M) was performed overnight at 4 °C before ultrathin cryosectioning at −120 °C on a Leica Microsystems FC7 cryo-ultramicrotome. Sections (80-nm thickness) were retrieved with a methylcellulose (2%)/sucrose (2.3 M) mixture (1:1) and collected onto formvar/carbon-coated nickel grids. After removal of gelatin at 37 °C, sections were incubated with PBS containing 1:200 Rabbit anti-eGFP (ABCAM, ref. AB6556). After six washes of PBS (5 min each), the grids were incubated with PBS containing 1:30 gold-conjugated Goat anti-Rabbit (6 nm) (Aurion, Wageningen, the Netherlands). The grids were finally washed in PBS (six washes of 2 min each) and rinsed with distilled water. The contrasting step was performed by

incubating grids in a 2% uranyl acetate/2% methylcellulose mixture (1:10). The sections were imaged with a JEOLJEM-1011 transmission electron microscope operating at 100 kV (JEOL 1011).

FLIM

Huh7 cells were transfected in 24-well plates with glass bottom (Porvair sciences, ref. 324041) with a DNA mixture containing plasmids expressing HBc and HBc-eGFP (ratio 0.7/0.3) or HBc and HBc-eGFP together with HBc-mCherry (ratio 0.7/0.1/0.2). The same ratio of plasmids was used for the expression of HBc-NTD, HBc-ΔαH3 and HBc-Δ124–135. This transfection was performed on three independent plates and incubated for 24, 48 and 72 h. Prior to FLIM analysis, cells were incubated in phenol red-free Leibovitz's L-15 medium (Thermo Fisher Scientific), supplemented with 20% FBS, 1% L-glutamine and 1% penicillin–streptomycin [95].

FLIM analyses were performed in the time domain with a time-gatedcustom-built setup [96] and driven by Inscoper imaging suite (www.inscoper.com). Briefly, cells were excited at 480 ± 10 nm using a white light laser, and emission was selected using a band pass filter of 525/50 nm for GFP donor fluorescence. Fluorescence lifetime was calculated with five sequential temporal gates of 2.2 ns each. Mean pixel-by-pixel lifetime was calculated using the following equation: $\langle \tau \rangle = \Sigma \Delta t_i \cdot I_i / \Sigma \mathrm{Ii}$, where Δt_i is the delay time of the *i*th image acquired following a laser pulse and I_i is the pixel-by-pixel fluorescence intensity in each image. Lifetime measurements and online calculations were performed with the Inscoper software. Pixel-by-pixel lifetime was calculated only when fluorescence intensity was above 3000 gray levels. The FRET efficiency (*E*) was calculated according to:

$$E = 1 - \frac{\tau DA}{\tau D} \quad (1)$$

where τ_{DA} is the lifetime of the donor in the presence of the acceptor and τ_D is the lifetime of the donor in the absence of the acceptor.

FCS

Huh7 cells were transfected in 24-well plates with glass bottom (Porvair sciences, ref. 324,041) with a DNA mixture containing plasmids expressing HBc and HBc-eGFP (ratio 0.7/0.3). As described for FLIM-FRET experiments, cells were incubated for 24, 48 and 72 h, and the medium was changed for phenol red-free Leibovitz's L-15 medium (Thermo Fisher Scientific), supplemented with 20% FBS, 1% L-glutamine and 1% penicillin–streptomycin prior to analysis [95].

FCS measurements were performed using a confocal microscope with an FCS module as previously described [97,98]. Our setup was composed of a Leica SP8 (Leica) inverted confocal microscope with a 63× water objective with correcting ring (NA 1.2) and combined with a PicoQuant time-correlated single-photon counting module (PicoHarp, PicoQuant). For the eGFP fluorescence, the Argon laser line at 488 nm was used and fluorescence emission at 500–550 nm was collected after the confocal pinhole using an avalanche photodiode detector (MPD, PicoQuant). FCS measurements were carried out with the Symphotime software (PicoQuant), integrated into the LAS-AF software (Leica). For each cell, the fluctuation of the fluorescence intensity in the confocal volume was analyzed by monitoring three independent points in the cytosol. These points were acquired sequentially and in non-photobleaching conditions for 30 s each. The PCH method was used to determine the brightness of the diffusing particles. PCH data were fitted with the FFS Data Processor software (SSTC, Minsk, Belarus) using a two-species model, with *N*1 and *N*2 being the number of particles of the core monomer and oligomers having *q1* and *q2* brightness values, respectively. *q1*, the brightness of the monomeric HBc-eGFP protein was fixed during the fit by using the mean of brightness value found in the same experimental conditions for a control situation where eGFP was expressed alone in living cells after the single species model fit. *q2*/*q1* gives directly the number of HBc-eGFP molecules present in the oligomers. *N1q1* + *N2q2* is directly proportional to the cellular concentration of the HBc-eGFP expressed in the cell. The ratio of the concentration of the oligomeric HBc-eGFP to the total concentration of HBc-eGFP is obtained as follows:

$$R = \frac{N2q2}{N1q1 + N2q2} \quad (2)$$

and corresponds to the % of GFP in assembled particles. To measure protein concentration, we applied the following formula using Na, the Avogadro constant, and *V*, the volume of the confocal spot (estimated at 0.3×10^{-15} L):

$$[\mathrm{HBc\text{–}eGFP}] = \frac{N1q1 + N2q2}{\mathrm{Na} \times V \times q1} \quad (3)$$

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.04.026.

Acknowledgments

We thank Stéphane Bressanelli and Giulia Bertolin for careful reading of the manuscript. We thank M. Nassal for plasmids encoding HBc-eGFP. This work was supported by the INSERM, ANRS and Tours

University. We also thank the Electron Microscopy (EM) Facility (IBiSA) of Tours University (http://microscopies.med.univ-tours.fr) for technical support.

Author Contributions

Virgile Rat: methodology, FRET acquisition, image analysis. Xavier Pinson: methodology, acquisition of FCS, data treatment. Florian Seigneuret: TEM and molecular biology. Stéphanie Durand: TEM. Charline Herrscher: FRET analysis. Julien Burlaud-Gaillard: sample preparation for TEM. Christophe Hourioux: molecular biology. Philippe Roingeard: validation, editing. Roxane Lemoine: cell sorting. Marc Tramier: conceptualization, validation, methodology. Hugues de Rocquigny: conceptualization, funding acquisition, supervision, writing of the manuscript.

Received 17 February 2020;
Received in revised form 25 April 2020;
Accepted 28 April 2020
Available online 01 May 2020

Keywords:
HBV;
capsid;
HBc;
assembly;
FRET-FLIM

†V.R., X.P. and F.S. contributed equally to this work.

Abbreviations used:
HBV, hepatitis B virus; HBc, hepatitis B core; FRET, fluorescence resonance energy transfer; FLIM, fluorescence lifetime imaging microscopy; TEM, transmission electron microscopy.

References

[1] Neuveut, C., Wei, Y., Buendia, M.A., (2010). Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis. *J. Hepatol.*, **52**, *594–604.*
[2] Prange, R., (2012). Host factors involved in hepatitis B virus maturation, assembly, and egress. *Med. Microbiol. Immunol.*, **201**, *449–461.*
[3] Venkatakrishnan, B., Zlotnick, A., (2016). The structural biology of hepatitis B virus: form and function. *Annu. Rev. Virol.*, **3**, *429–451.*
[4] Nassal, M., (2015). HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut,* **64**, *1972–1984.*
[5] Dane, D.S., Cameron, C.H., Briggs, M., (1970). Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet (London, England),* **1**, *695–698.*
[6] Blumberg, B.S., (1977). Australia antigen and the biology of hepatitis B. *Science (New York, NY),* **197**, *17–25.*
[7] Bruss, V., (2007). Hepatitis B virus morphogenesis. *World J. Gastroenterol.,* **13**, *65–73.*
[8] Hu, J., Liu, K., (2017). Complete and incomplete hepatitis B virus particles: formation, function, and application. *Viruses,* **9**,.
[9] Porterfield, J.Z., Dhason, M.S., Loeb, D.D., Nassal, M., Stray, S.J., Zlotnick, A., (2010). Full-length hepatitis B virus core protein packages viral and heterologous RNA with similarly high levels of cooperativity. *J. Virol.,* **84**, *7174–7184.*
[10] Heger-Stevic, J., Zimmermann, P., Lecoq, L., Bottcher, B., Nassal, M., (2018). Hepatitis B virus core protein phosphorylation: identification of the SRPK1 target sites and impact of their occupancy on RNA binding and capsid structure. *PLoS Pathog.,* **14**, *e1007488.*
[11] Wingfield, P.T., Stahl, S.J., Williams, R.W., Steven, A.C., (1995). Hepatitis core antigen produced in *Escherichia coli*: subunit composition, conformational analysis, and in vitro capsid assembly. *Biochemistry,* **34**, *4919–4932.*
[12] Ludgate, L., Liu, K., Luckenbaugh, L., Streck, N., Eng, S., Voitenleitner, C., et al., (2016). Cell-free hepatitis B virus capsid assembly dependent on the Core protein C-terminal domain and regulated by phosphorylation. *J. Virol.,* **90**, *5830–5844.*
[13] Yang, S.Q., Walter, M., Standring, D.N., (1992). Hepatitis B virus p25 precore protein accumulates in *Xenopus* oocytes as an untranslocated phosphoprotein with an uncleaved signal peptide. *J. Virol.,* **66**, *37–45.*
[14] Seifer, M., Zhou, S., Standring, D.N., (1993). A micromolar pool of antigenically distinct precursors is required to initiate cooperative assembly of hepatitis B virus capsids in *Xenopus* oocytes. *J. Virol.,* **67**, *249–257.*
[15] Ponsel, D., Bruss, V., (2003). Mapping of amino acid side chains on the surface of hepatitis B virus capsids required for envelopment and virion formation. *J. Virol.,* **77**, *416–422.*
[16] Koschel, M., Oed, D., Gerelsaikhan, T., Thomssen, R., Bruss, V., (2000). Hepatitis B virus core gene mutations which block nucleocapsid envelopment. *J. Virol.,* **74**, *1–7.*
[17] Lanford, R.E., Notvall, L., (1990). Expression of hepatitis B virus core and precore antigens in insect cells and characterization of a core-associated kinase activity. *Virology,* **176**, *222–233.*
[18] Patel, N., White, S.J., Thompson, R.F., Bingham, R., Weiss, E.U., Maskell, D.P., et al., (2017). HBV RNA pre-genome encodes specific motifs that mediate interactions with the viral core protein that promote nucleocapsid assembly. *Nat. Microbiol.,* **2**, *17098.*
[19] Wynne, S.A., Crowther, R.A., Leslie, A.G., (1999). The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. *Mol. Cell,* **3**, *771–780.*
[20] Zlotnick, A., Cheng, N., Conway, J.F., Booy, F.P., Steven, A. C., Stahl, S.J., et al., (1996). Dimorphism of hepatitis B virus capsids is strongly influenced by the C-terminus of the capsid protein. *Biochemistry,* **35**, *7412–7421.*
[21] Hatton, T., Zhou, S., Standring, D.N., (1992). RNA- and DNA-binding activities in hepatitis B virus capsid protein: a model for their roles in viral replication. *J. Virol.,* **66**, *5232–5241.*
[22] Nassal, M., (1992). The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly. *J. Virol.,* **66**, *4107–4116.*
[23] Lewellyn, E.B., Loeb, D.D., (2011). The arginine clusters of the carboxy-terminal domain of the core protein of hepatitis B virus make pleiotropic contributions to genome replication. *J. Virol.,* **85**, *1298–1309.*

[24] Chen, C., Wang, J.C., Zlotnick, A., (2011). A kinase chaperones hepatitis B virus capsid assembly and captures capsid dynamics in vitro. *PLoS Pathog.,* **7**, *e1002388.*
[25] Wang, J.C., Dhason, M.S., Zlotnick, A., (2012). Structural organization of pregenomic RNA and the carboxy-terminal domain of the capsid protein of hepatitis B virus. *PLoS Pathog.,* **8**, *e1002919.*
[26] Rabe, B., Vlachou, A., Pante, N., Helenius, A., Kann, M., (2003). Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* **100**, *9849–9854.*
[27] Gallina, A., Bonelli, F., Zentilin, L., Rindi, G., Muttini, M., Milanesi, G., (1989). A recombinant hepatitis B core antigen polypeptide with the protamine-like domain deleted self-assembles into capsid particles but fails to bind nucleic acids. *J. Virol.,* **63**, *4645–4652.*
[28] Yu, X., Jin, L., Jih, J., Shih, C., Zhou, Z.H., (2013). 3.5 Å cryoEM structure of hepatitis B virus core assembled from full-length core protein. *PloS One,* **8**, *e69729.*
[29] Watts, N.R., Conway, J.F., Cheng, N., Stahl, S.J., Belnap, D. M., Steven, A.C., et al., (2002). The morphogenic linker peptide of HBV capsid protein forms a mobile array on the interior surface. *EMBO J.,* **21**, *876–884.*
[30] Liu, K., Luckenbaugh, L., Ning, X., Xi, J., Hu, J., (2018). Multiple roles of core protein linker in hepatitis B virus replication. *PLoS Pathog.,* **14**, *e1007085.*
[31] Chu, T.H., Liou, A.T., Su, P.Y., Wu, H.N., Shih, C., (2014). Nucleic acid chaperone activity associated with the arginine-rich domain of human hepatitis B virus core protein. *J. Virol.,* **88**, *2530–2543.*
[32] Gallucci, L., Kann, M., (2017). Nuclear import of hepatitis B virus capsids and genome. *Viruses,* **9**,.
[33] Martinez, M.G., Testoni, B., Zoulim, F., (2019). Biological basis for functional cure of chronic hepatitis B. *J. Viral Hepat.,* **26**, *786–794.*
[34] Bottcher, B., Wynne, S.A., Crowther, R.A., (1997). Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. *Nature,* **386**, *88–91.*
[35] Conway, J.F., Cheng, N., Zlotnick, A., Wingfield, P.T., Stahl, S.J., Steven, A.C., (1997). Visualization of a 4-helix bundle in the hepatitis B virus capsid by cryo-electron microscopy. *Nature,* **386**, *91–94.*
[36] Crowther, R.A., Kiselev, N.A., Bottcher, B., Berriman, J.A., Borisova, G.P., Ose, V., et al., (1994). Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell,* **77**, *943–950.*
[37] Bourne, C.R., Finn, M.G., Zlotnick, A., (2006). Global structural changes in hepatitis B virus capsids induced by the assembly effector HAP1. *J. Virol.,* **80**, *11055–11061.*
[38] Selzer, L., Katen, S.P., Zlotnick, A., (2014). The hepatitis B virus core protein intradimer interface modulates capsid assembly and stability. *Biochemistry,* **53**, *5496–5504.*
[39] Sun, D., Nassal, M., (2006). Stable HepG2- and Huh7-based human hepatoma cell lines for efficient regulated expression of infectious hepatitis B virus. *J. Hepatol.,* **45**, *636–645.*
[40] Kratz, P.A., Bottcher, B., Nassal, M., (1999). Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* **96**, *1915–1920.*
[41] Vogel, M., Diez, M., Eisfeld, J., Nassal, M., (2005). In vitro assembly of mosaic hepatitis B virus capsid-like particles (CLPs): rescue into CLPs of assembly-deficient core protein fusions and FRET-suited CLPs. *FEBS Lett.,* **579**, *5211–5216.*
[42] Yoo, L., Park, J.S., Kwon, K.C., Kim, S.E., Jin, X., Kim, H., et al., (2012). Fluorescent viral nanoparticles with stable in vitro and in vivo activity. *Biomaterials,* **33**, *6194–6200.*
[43] Weigand, K., Knaust, A., Schaller, H., (2010). Assembly and export determine the intracellular distribution of hepatitis B virus core protein subunits. *J. Gen. Virol.,* **91**, *59–67.*
[44] Chen, J.Y., Gan, C.Y., Cai, X.F., Zhang, W.L., Long, Q.X., Wei, X. F., et al., (2018). Fluorescent protein tagged hepatitis B virus capsid protein with long glycine-serine linker that supports nucleocapsid formation. *J. Virol. Methods,* **255**, *52–59.*
[45] Schodel, F., Wirtz, R., Peterson, D., Hughes, J., Warren, R., Sadoff, J., et al., (1994). Immunity to malaria elicited by hybrid hepatitis B virus core particles carrying circumsporozoite protein epitopes. *J. Exp. Med.,* **180**, *1037–1046.*
[46] Boulter, N.R., Glass, E.J., Knight, P.A., Bell-Sakyi, L., Brown, C.G., Hall, R., (1995). Theileria annulata sporozoite antigen fused to hepatitis B core antigen used in a vaccination trial. *Vaccine,* **13**, *1152–1160.*
[47] Shaner, N.C., Steinbach, P.A., Tsien, R.Y., (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods,* **2**, *905–909.*
[48] Vogel, M., Vorreiter, J., Nassal, M., (2005). Quaternary structure is critical for protein display on capsid-like particles (CLPs): efficient generation of hepatitis B virus CLPs presenting monomeric but not dimeric and tetrameric fluorescent proteins. *Proteins,* **58**, *478–488.*
[49] Ning, X., Luckenbaugh, L., Liu, K., Bruss, V., Sureau, C., Hu, J., (2018). Common and distinct capsid and surface protein requirements for secretion of complete and genome-free hepatitis B virions. *J. Virol.,* **92**,.
[50] Deroubaix, A., Osseman, Q., Cassany, A., Begu, D., Ragues, J., Kassab, S., et al., (2015). Expression of viral polymerase and phosphorylation of core protein determine core and capsid localization of the human hepatitis B virus. *J. Gen. Virol.,* **96**, *183–195.*
[51] Rat, V., Seigneuret, F., Burlaud-Gaillard, J., Lemoine, R., Hourioux, C., Zoulim, F., et al., (2019). BAY 41-4109-mediated aggregation of assembled and misassembled HBV capsids in cells revealed by electron microscopy. *Antivir. Res.,* **169**, *104557.*
[52] El Meshri, S.E., Dujardin, D., Godet, J., Richert, L., Boudier, C., Darlix, J.L., et al., (2015). Role of the nucleocapsid domain in HIV-1 Gag oligomerization and trafficking to the plasma membrane: a fluorescence lifetime imaging microscopy investigation. *J. Mol. Biol.,* **427**, *1480–1494.*
[53] Maldonado, J.O., Angert, I., Cao, S., Berk, S., Zhang, W., Mueller, J.D., et al., (2017). Perturbation of human T-cell leukemia virus type 1 particle morphology by differential Gag co-packaging. *Viruses,* **9**,.
[54] Tramier, M., Zahid, M., Mevel, J.C., Masse, M.J., Coppey-Moisan, M., (2006). Sensitivity of CFP/YFP and GFP/mCherry pairs to donor photobleaching on FRET determination by fluorescence lifetime imaging microscopy in living cells. *Microsc. Res. Tech.,* **69**, *933–939.*
[55] Padilla-Parra, S., Tramier, M., (2012). FRET microscopy in the living cell: different approaches, strengths and weaknesses. *BioEssays,* **34**, *369–376.*
[56] Richert, L., Didier, P., de Rocquigny, H., Mély, Y., (2015). Monitoring HIV-1 protein oligomerization by FLIM FRET microscopy advanced time-correlated single photon counting applications. *Springer Series in Chemical Physics,* **111**, *277–307.*
[57] Pepperkok, R., Squire, A., Geley, S., Bastiaens, P.I., (1999). Simultaneous detection of multiple green fluorescent proteins

in live cells by fluorescence lifetime imaging microscopy. *Curr. Biol.,* **9**, *269–272.*
[58] Merzlyak, E.M., Goedhart, J., Shcherbo, D., Bulina, M.E., Shcheglov, A.S., Fradkov, A.F., et al., (2007). Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nat. Methods,* **4**, *555–557.*
[59] Albertazzi, L., Arosio, D., Marchetti, L., Ricci, F., Beltram, F., (2009). Quantitative FRET analysis with the EGFP-mCherry fluorescent protein pair. *Photochem. Photobiol.,* **85**, *287–297.*
[60] Kumar, S., Alibhai, D., Margineanu, A., Laine, R., Kennedy, G., McGinty, J., et al., (2011). FLIM FRET technology for drug discovery: automated multiwell-plate high-content analysis, multiplexed readouts and application in situ. *Chemphyschem,* **12**, *609–626.*
[61] Teitler, M., Herrick-Davis, K., (2014). Determining the oligomer number of native GPCR using florescence correlation spectroscopy and drug-induced inactivation-reactivation. *Curr. Pharm. Biotechnol.,* **15**, *927–937.*
[62] Walter, A., Chapuis, C., Huet, S., Ellenberg, J., (2013). Crowded chromatin is not sufficient for heterochromatin formation and not required for its maintenance. *J. Struct. Biol.,* **184**, *445–453.*
[63] Macdonald, P., Johnson, J., Smith, E., Chen, Y., Mueller, J. D., (2013). Brightness analysis. *Methods Enzymol.,* **518**, *71–98.*
[64] Fogarty, K.H., Berk, S., Grigsby, I.F., Chen, Y., Mansky, L.M., Mueller, J.D., (2014). Interrelationship between cytoplasmic retroviral Gag concentration and Gag–membrane association. *J. Mol. Biol.,* **426**, *1611–1624.*
[65] Larson, D.R., Ma, Y.M., Vogt, V.M., Webb, W.W., (2003). Direct measurement of Gag–Gag interaction during retrovirus assembly with FRET and fluorescence correlation spectroscopy. *J. Cell Biol.,* **162**, *1233–1244.*
[66] Hogue, I.B., Hoppe, A., Ono, A., (2009). Quantitative fluorescence resonance energy transfer microscopy analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Gag–Gag interaction: relative contributions of the CA and NC domains and membrane binding. *J. Virol.,* **83**, *7322–7336.*
[67] Hendrix, J., Baumgartel, V., Schrimpf, W., Ivanchenko, S., Digman, M.A., Gratton, E., et al., (2015). Live-cell observation of cytosolic HIV-1 assembly onset reveals RNA-interacting Gag oligomers. *J. Cell Biol.,* **210**, *629–646.*
[68] Ferrer, M., Henriet, S., Chamontin, C., Laine, S., Mougel, M., (2016). From cells to virus particles: quantitative methods to monitor RNA packaging. *Viruses,* **8**,.
[69] Ivanchenko, S., Godinez, W.J., Lampe, M., Krausslich, H.G., Eils, R., Rohr, K., et al., (2009). Dynamics of HIV-1 assembly and release. *PLoS Pathog.,* **5**, *e1000652.*
[70] Prescher, J., Baumgartel, V., Ivanchenko, S., Torrano, A.A., Brauchle, C., Muller, B., et al., (2015). Super-resolution imaging of ESCRT-proteins at HIV-1 assembly sites. *PLoS Pathog.,* **11**, *e1004677.*
[71] Favard, C., Chojnacki, J., Merida, P., Yandrapalli, N., Mak, J., Eggeling, C., et al., (2019). HIV-1 Gag specifically restricts PI (4,5)P2 and cholesterol mobility in living cells creating a nanodomain platform for virus assembly. *Sci. Adv.,* **5**, *eaaw8651.*
[72] Chojnacki, J., Muller, B., (2013). Investigation of HIV-1 assembly and release using modern fluorescence imaging techniques. *Traffic (Copenhagen, Denmark),* **14**, *15–24.*
[73] Inamdar, K., Floderer, C., Favard, C., Muriaux, D., (2019). Monitoring HIV-1 assembly in living cells: insights from dynamic and single molecule microscopy. *Viruses,* **11**,.
[74] Jouvenet, N., Simon, S.M., Bieniasz, P.D., (2011). Visualizing HIV-1 assembly. *J. Mol. Biol.,* **410**, *501–511.*
[75] Sharma, K.K., Marzinek, J.K., Tantirimudalige, S.N., Bond, P. J., Wohland, T., (2019). Single-molecule studies of flavivirus envelope dynamics: experiment and computation. *Prog. Biophys. Mol. Biol.,* **143**, *38–51.*
[76] Veerapathiran, S., Wohland, T., (2018). Fluorescence techniques in developmental biology. *J. Biosci.,* **43**, *541–553.*
[77] Chen, Y., Wei, L.N., Muller, J.D., (2003). Probing protein oligomerization in living cells with fluorescence fluctuation spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* **100**, *15492–15497.*
[78] Fogarty, K.H., Chen, Y., Grigsby, I.F., Macdonald, P.J., Smith, E.M., Johnson, J.L., et al., (2011). Characterization of cytoplasmic Gag–Gag interactions by dual-color z-scan fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biophys. J.,* **100**, *1587–1595.*
[79] Chen, Y., Wu, B., Musier-Forsyth, K., Mansky, L.M., Mueller, J.D., (2009). Fluorescence fluctuation spectroscopy on viral-like particles reveals variable gag stoichiometry. *Biophys. J.,* **96**, *1961–1969.*
[80] Zhao, Q., Hu, Z., Cheng, J., Wu, S., Luo, Y., Chang, J., et al., (2018). Hepatitis B virus core protein dephosphorylation occurs during pregenomic RNA encapsidation. *J. Virol.,* **92**,.
[81] Jung, J., Hwang, S.G., Chwae, Y.J., Park, S., Shin, H.J., Kim, K., (2014). Phosphoacceptors threonine 162 and serines 170 and 178 within the carboxyl-terminal RRRS/T motif of the hepatitis B virus core protein make multiple contributions to hepatitis B virus replication. *J. Virol.,* **88**, *8754–8767.*
[82] Su, P.-Y., Yang, C.-J., Chu, T.-H., Chang, C.-H., Chiang, C., Tang, F.-M., et al., (2016). HBV maintains electrostatic homeostasis by modulating negative charges from phosphoserine and encapsidated nucleic acids. *Sci. Rep., 38959.*
[83] Yeh, C.T., Liaw, Y.F., Ou, J.H., (1990). The arginine-rich domain of hepatitis B virus precore and core proteins contains a signal for nuclear transport. *J. Virol.,* **64**, *6141–6147.*
[84] Kann, M., Sodeik, B., Vlachou, A., Gerlich, W.H., Helenius, A., (1999). Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.,* **145**, *45–55.*
[85] Mettenleiter, T.C., (2002). Herpesvirus assembly and egress. *J. Virol.,* **76**, *1537–1547.*
[86] Sundquist, W.I., Krausslich, H.G., (2012). HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.,* **2**, *a006924.*
[87] Rabe, B., Delaleau, M., Bischof, A., Foss, M., Sominskaya, I., Pumpens, P., et al., (2009). Nuclear entry of hepatitis B virus capsids involves disintegration to protein dimers followed by nuclear reassociation to capsids. *PLoS Pathog.,* **5**, *e1000563.*
[88] Zlotnick, A., Porterfield, J.Z., Wang, J.C., (2013). To build a virus on a nucleic acid substrate. *Biophys. J.,* **104**, *1595–1604.*
[89] Dokland, T., (1999). Scaffolding proteins and their role in viral assembly. *Cell. Mol. Life Sci.,* **56**, *580–603.*
[90] Konig, S., Beterams, G., Nassal, M., (1998). Mapping of homologous interaction sites in the hepatitis B virus core protein. *J. Virol.,* **72**, *4997–5005.*
[91] Nassal, M., Skamel, C., Kratz, P.A., Wallich, R., Stehle, T., Simon, M.M., (2005). A fusion product of the complete Borrelia burgdorferi outer surface protein A (OspA) and the hepatitis B virus capsid protein is highly immunogenic and

induces protective immunity similar to that seen with an effective lipidated OspA vaccine formula. *Eur. J. Immunol.*, **35**, *655–665.*

[92] Geldmacher, A., Skrastina, D., Petrovskis, I., Borisova, G., Berriman, J.A., Roseman, A.M., et al., (2004). An amino-terminal segment of hantavirus nucleocapsid protein presented on hepatitis B virus core particles induces a strong and highly cross-reactive antibody response in mice. *Virology*, **323**, *108–119.*

[93] Park, J.S., Cho, M.K., Lee, E.J., Ahn, K.Y., Lee, K.E., Jung, J.H., et al., (2009). A highly sensitive and selective diagnostic assay based on virus nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.*, **4**, *259–264.*

[94] Roingeard, P., Romet-Lemonne, J.L., Leturcq, D., Goudeau, A., Essex, M., (1990). Hepatitis B virus core antigen (HBc Ag) accumulation in an HBV nonproducer clone of HepG2-transfected cells is associated with cytopathic effect. *Virology*, **179**, *113–120.*

[95] Bertolin, G., Sizaire, F., Herbomel, G., Reboutier, D., Prigent, C., Tramier, M., (2016). A FRET biosensor reveals spatio-temporal activation and functions of aurora kinase A in living cells. *Nat. Commun.*, **7**, *12674.*

[96] Leray, A., Padilla-Parra, S., Roul, J., Heliot, L., Tramier, M., (2013). Spatio-temporal quantification of FRET in living cells by fast time-domain FLIM: a comparative study of non-fitting methods [corrected]. *PLoS One*, **8**, *e69335.*

[97] Ziegler, C.S., Bouchab, L., Tramier, M., Durand, D., Fieschi, F., Dupre-Crochet, S., et al., (2019). Quantitative live-cell imaging and 3D modeling reveal critical functional features in the cytosolic complex of phagocyte NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.*, **294**, *3824–3836.*

[98] Bertolin, G., Sizaire, F., Demeautis, C., Chapuis, C., Merola, F., Erard, M., et al., (2019). Optimized FRET pairs and quantification approaches to detect the activation of Aurora kinase A at mitosis. *ACS Sens.*, **4**, *2018–2027.*

[99] Ladner, S.K., Otto, M.J., Barker, C.S., Zaifert, K., Wang, G. H., Guo, J.T., et al., (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.*

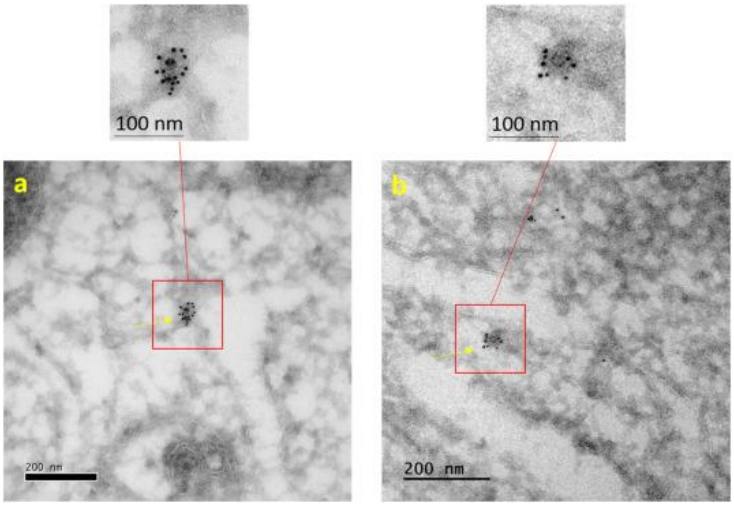


Figure S1. Immunogold labeling of HBc by cryo-electron microscopy (Tokuyasu method). HBV capsids produced in Huh7 cells after transfection with a mixture of plasmids (ratio 0.7/0.3) expressing HBc and HBc-eGFP (Figure 6) were compared with HBV capsid produced in HepAD38 (a) and in Huh7 cells after transfection of a plasmid expressing 1.1-fold HBV genome (b). (a) HBV particles observed in HepAD38 cell. HepAD38 cells are an inducible human hepatoblastoma cell line harboring an integrated tetracycline-responsive 1.2-fold HBV genome (serotype ayw, genotype D) [99]. HepaD38 cells were grown in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum and 1% of an antibiotic mixture (penicillin/streptomycin) at 37 °C in a 5% CO_2 atmosphere. (b) Huh7 (differentiated hepatocyte-derived carcinoma cell line) were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum and 1% of an antibiotic mixture (penicillin/streptomycin) at 37 °C in a 5% CO_2 atmosphere. 10 × 10^6 Huh7 cells plated in a T75 flask and transfected with 9 µg of plasmid expressing 1.1-fold HBV genome (serotype ayw, genotype D) and 1 µg of GFP plasmid, were treated with trypsin and resuspended in ice-cold complete medium (DMEM, 10% FBS). Cells eGFP positive were then sorted by FACS. Both cell lines were prepared for immunolabeling and imaged TEM as described in the Materials and Methods section. The rabbit anti-eGFP was substituted for a human anti-HBc (dilution: 1:200, [94]) and the gold-conjugated Goat anti-Rabbit (6 nm) for a gold-conjugated Goat anti-human (dilution: 1:30; 6 nm). HBV capsids are highlighted by yellow arrows. Scale is reported at the bottom left.

II. Etude de résidus impliqués dans la morphogenèse du VHB

1. Introduction

Ces travaux sur des délétions de la protéine HBc posent toutefois des questions sur la sensibilité de la technique vis à vis de modifications plus fines de la protéine de capside. En effet ces délétions de larges parties de la protéine de capside pouvaient facilement provoquer une modification de l'oligomérisation. Qu'en est-il donc de mutations plus fines comme la mutation ponctuelle d'un résidu ?

Par conséquent nous avons muté HBc sur deux acides aminés :

La première mutation F97L est connue comme survenant de façon naturelle chez les patients. Celle-ci provoque une sécrétion de virions immatures, contenant majoritairement un ADN simple brin négatif (Yuan et al. 1999). Cette mutation augmente la taille de la poche hydrophobe de core, provoque un assemblage de la capside plus rapide, et un enveloppement précoce (Alexander et al. 2013; Ceres, Stray, et Zlotnick 2004). Néanmoins, les données structurales obtenues par le groupe de Nassal montrent que cette mutation aboutit à la formation de capsides morphologiquement comparables aux capsides sauvages (Böttcher et Nassal 2018).

La seconde mutation Y132A se situe dans la région 124-135 précédemment décrite comme essentielle pour l'interaction des dimères entre eux. La mutation Y132A provoque une diminution de la stabilité de la liaison entre les dimères qui par conséquent ne s'assemblent pas en capsides (Packianathan et al. 2010; C. R. Bourne et al. 2009; Patterson et al. 2020; Y. Luo et al. 2021; Z. Hu et al. 2020). Ce défaut d'assemblage peut être restauré *in vitro* par la complémentation en core sauvage, néanmoins les capsides ainsi formées ont une faible stabilité (C. R. Bourne et al. 2009). Notre étude s'est donc poursuivie sur le suivi de ces mutations en milieu cellulaire par l'association d'outils précédemment décrite en utilisant le FLIM et la microscopie électronique.

2. Présentation des résultats obtenus

Nous avons donc construit des plasmides exprimant les mutant HBcF97L et HBcY132A et leurs homologues fluorescents comme précédemment décrit (Rat et al. 2020) (Figure 32, A). Nous avons tout d'abord vérifié la production de protéines en transfectant des cellules HuH-7 avec les différentes constructions. Les cellules ont alors été lysées et les protéines étudiées par western blot (Figure 32, B). Cette figure montre que les différentes protéines mutées et leur équivalents chimériques eGFP et mCherry sont produites aux poids attendus. Toutefois nous

observons une bande de dégradation des mutants tagués mCherry à environ 30kDa. Cette bande était déjà observée dans nos précédents travaux et correspond au poids moléculaire de la protéine mCherry seule. L'analyse par densitométrie de ces gels a permis de montrer qu'au sein des constructions, les protéines taguées eGFP et mCherry sont produites dans le même ordre de grandeur, avec toutefois une production plus faible de protéine non taguée pour les deux mutants.

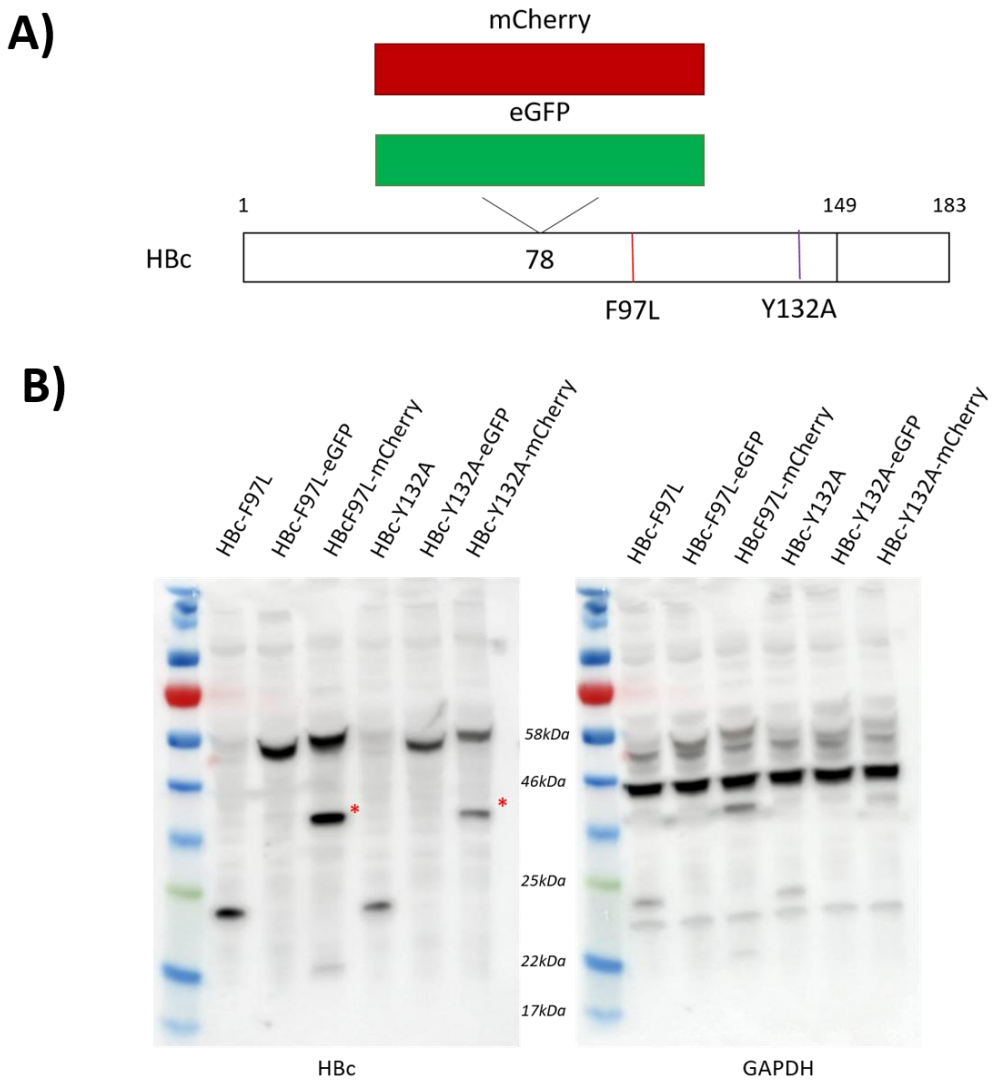


Figure 32 : Analyse par western blot de l'expression des mutants F97L et Y132 et de leurs homologues fluorescents. (A) Représentation schématique des sites d'insertion de l'eGFP et de la mCherry. (B) Western-Blot des mutants F97L et Y132A d'HBc, HBc-eGFP et HBc-mCherry. Des cellules HuH-7 ont été transfectées avec un plasmide exprimant HBc ou ses dérivés et récoltées 24h post-transfection. 50µg de protéines sont dénaturées puis mises à migrer en SDS-PAGE puis transférées sur une membrane avant d'être révélées avec un anti-core et un anti-GAPDH. * : forme dégradée des protéines fusion mCherry.

Les mutants et leurs dérivés fluorescents ont été observés par microscopie confocale afin de vérifier leur localisation cellulaire. Des cellules HuH-7 ont été transfectées par HBc ou les dérivés (Figure 33, haut), ou avec un mélange d'HBc ou des mutants avec leur homologue eGFP (ratio0.7/0.3) (Figure 33, bas). Les protéines non taguées ont été marquées par un anti-HBc et révélées par un anticorps secondaire couplé à un Alexa 488. Nous observons que les trois protéines se localisent de manière similaire dans le noyau et dans le cytoplasme. La fluorescence apparait sous forme de petits points fluorescents (HBc et HBc F97L, première ligne) ou plus diffuse (HBcY132A, première ligne). La même expérience, cette fois ci effectuée en suivant les protéines par l'eGFP montre des localisations proches de celles observées par immunofluorescence. Nous retrouvons également un aspect punctiforme pour les deux constructions HBcWT-eGFP et HBc-F97L et un aspect plus diffus pour HBcY132A-eGFP. Il semble donc que l'insertion de l'eGFP n'ait pas un effet majeur sur la localisation cellulaire de ces protéines même si dans le cas du mutants HBcY132A-eGFP nous observons une diffusion de la protéine chimérique dans les nucléoles.

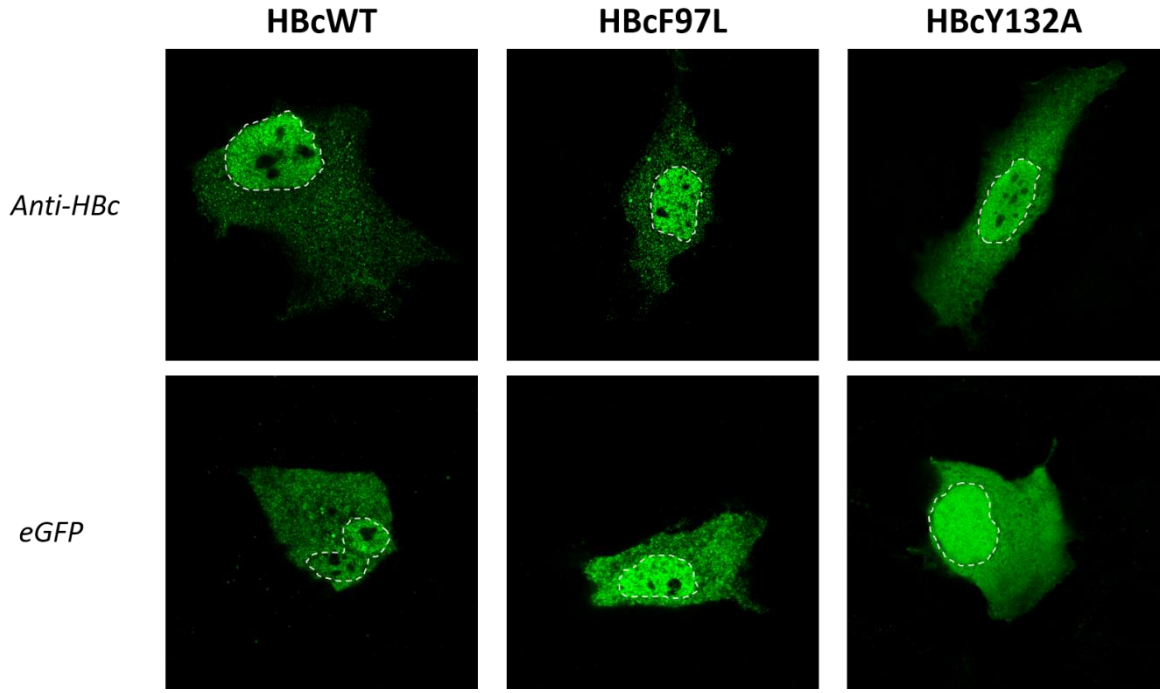


Figure 33 : Les mutations F97L et Y132A ne modifient pas le phénotype de la core. Des cellules HuH-7 ont été transfectées par un plasmide exprimant la protéine core sauvage, ou les mutants F97L ou Y132A (haut) et en parallèle par l'HBc/HBc-eGFP et les dérivés (bas). Les cellules sont fixée 24h après transfection et la core sauvage et les mutants sont révélés par immunofluorescence (haut) ou par le tag eGFP (bas). Les noyaux sont montrés par les pointillés gris.

Nous avons alors étudié par FLIM l'auto-assemblage des mutants. Nos cellules HuH-7 ont été transfectées par 70% de plasmide non tagué, 20% de plasmide core-mCherry et 10% de plasmide core-eGFP. Ces proportions étaient utilisées dans nos précédents travaux (Rat et al. 2020). Les cellules sont observées sur un Leica SP8 par FLIM et chaque pixel est colorisé avec une couleur représentant un temps de vie indiqué par l'échelle arbitraire sous les images de FLIM (Figure 34.a). L'eGFP et l'eGFP-mCherry sont des témoins de l'efficacité FRET dans notre système. Le temps de vie de l'eGFP est de 2.35±0.05ns et apparait dans une couleur jaune tandis que l'eGFP-mCherry possède un temps de vie qui se situe à 1.8±0.02ns, en vert (Figure 34, A, (a) et (b)).

L'HBcWT-eGFP est à un temps de vie d'en moyenne 1.8ns±0.11ns, ce qui est représenté par des cellules vertes (Figure 34, A, (c)). Cette différence entre eGFP et HBc-eGFP a précédemment été rapportée (Rat et al. 2020). Cette diminution du temps de vie de l'eGFP est également observée lorsque les cellules expriment HBcF97L-eGFP (1.8±0.04ns) et l'HBcY132A-eGFP (2±0.014ns) (Figure 34, A, respectivement (e) et (g)). Lorsque les cellules sont transfectées par l'HBcWT et ses homologues fluorescents eGFP et mCherry, le temps de vie est à 1.13±0.04ns, et les cellules sont imagées en bleu (Figure 34, A, (d)). Lorsque les cellules sont transfectées par l'HBcF97L et ses homologues fluorescents eGFP et mCherry, le temps de vie est à 1.2±0.06ns et les cellules sont elles aussi bleutées (Figure 34, A, (f)). Inversement lorsque les cellules expriment l'HBcY132A et ses homologues fluorescents eGFP et mCherry, le temps de vie est de 1.68±0.05ns (Figure 34, A, (h)). A partir de ces temps de vie nous avons calculé l'efficacité de FRET pour chaque condition (Figure 34, B). Ainsi nous observons une efficacité de 36.7±3.7% pour HBcWT, ce qui est comparable à ce que nous avions déjà obtenu (Rat et al. 2020)(Figure 34, B, en jaune). L'efficacité du FRET du mutant F97L est de 39.6±7.4%, similaire à celui obtenu pour HBcWT lors que celle de la mutation de la tyrosine 132 est significativement diminuée à 16±3.9% (Figure 34, B respectivement en rouge et en bleu). Ainsi par FLIM nos deux mutants sont clairement différents et le mutant HBcY132A conserve la possibilité de s'assembler mais sous forme d'oligomères probablement moins denses. Nous remarquons que dans ces cellules observées par FLIM la localisation du signal dans le noyau et dans le cytoplasme est similaire à celle observée par microscopie confocale.

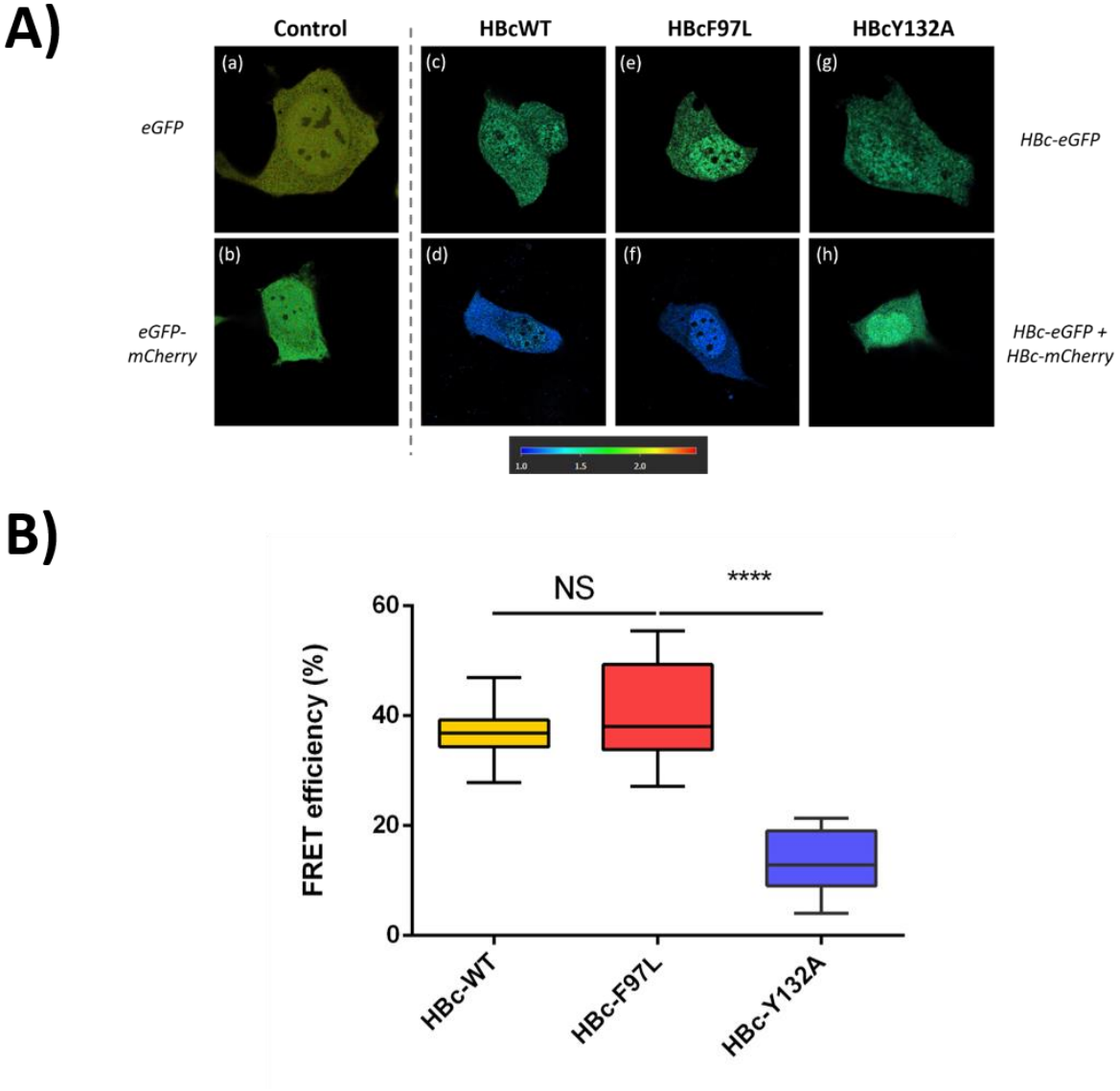


Figure 34 : Effet des mutations sur l'efficacité de FRET. (A) Imagerie par FLIM de cellules HuH-7 transfectées. Les cellules ont été transfectées comme précédemment décrit (Rat et al. 2020) . Les cellules vivantes ont été observées 24h après transfection et le temps de vie de l'eGFP a été déterminé pour chaque pixel colorisé en conséquence avec la valeur correspondante sur l'échelle sous les images. eGFP-mCherry correspond à l'eGFP et la mCherry fusionnées et est à comparer avec l'eGFP seule. Les temps de vie d'HBc-eGFP et des dérivés mutés sont imagés sur la ligne du haut, dans la partie de droite et comparés avec la ligne du bas représentant les transfections d'HBc et des dérivés mutés en présence de leurs homologues fluorescents mCherry. (B) Histogramme des efficacités de FRET. Les boites à moustache des efficacités de FRET sont calculées en utilisant l'Eq_1 (Cf. partie Matériel et méthodes), où τ_{DA} est le temps de vie du donneur en présence de l'accepteur et τ_D est le temps de vie du donneur seul. Un test t a été fait pour comparer les valeurs de 150 cellules provenant de 3 expériences indépendantes (**** : p-value < 10^{-4}).

Cependant, l'interaction observée pour le mutant F97L ne signifie pas pour autant que cette protéine est capable de former des capsides natives. En effet, nos précédents travaux ont montré que la délétion de l'hélice 3 aboutit à un FRET élevé qui ne correspond pas à la formation de capsides. De plus, nous obtenons un FRET diminué à environ 16% pour le mutant Y132A. Cette valeur est plus faible que la protéine sauvage mais largement supérieure au mutant HBc-NTD précédemment décrit à 5% (Rat et al. 2020). Nous avons donc voulu investiguer la présence ou non de capside formées par ces mutants par microscopie électronique. Par conséquent nous avons transfecté des cellules HuH-7 avec un mélange contenant 70% de protéines non taguées et 30% de protéines taguées par l'eGFP et après immunomarquage de l'eGFP par des billes d'or, les avons étudiés par microscopie électronique à transmission. Comme le montre la Figure 35 nous avons pu observer des capsides de 30nm pour les cellules transfectées par HBcWT et par HBcF97L, identifiées par des flèches jaune dans les encarts I et II pour l'HBcWT et rouge et dans les encarts III et IV, pour l'HBcF97L (Figure 35, A et B). En revanche, malgré la présence de clusters de billes visibles dans les encarts V et VI, aucune capside n'a pu être observée pour les cellules transfectées par l'HBcY132A (Figure 35, C).

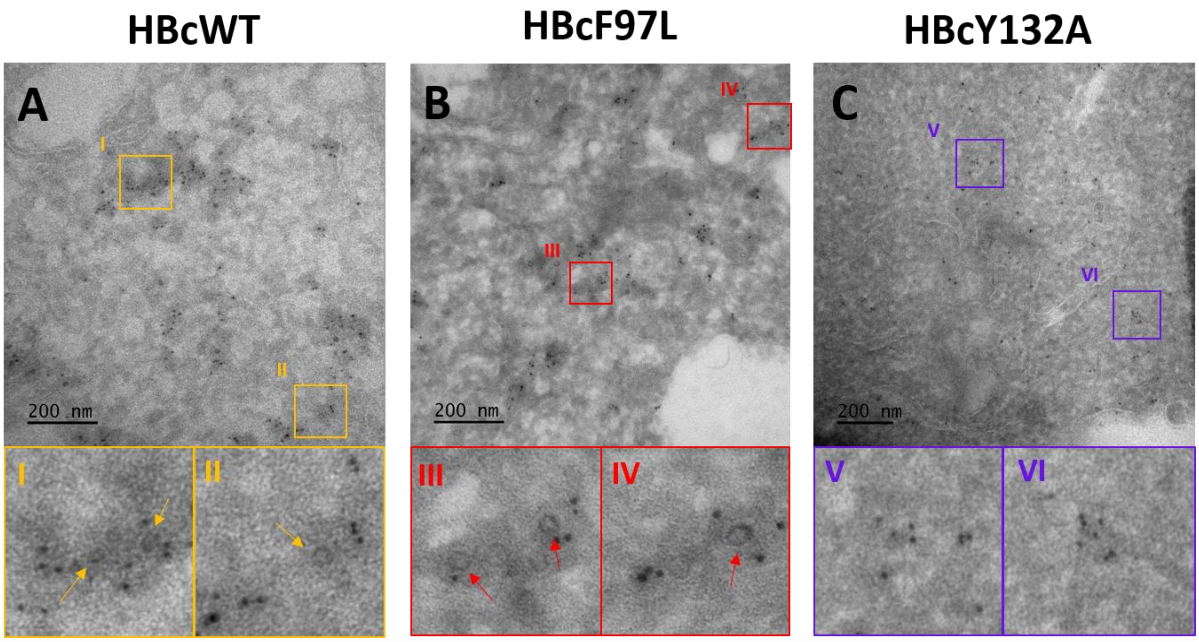


Figure 35 : Images de microscopie électronique à transmission d'HBc et ses mutants révélés par un immunomarquage aux billes d'or. Des cellules HuH-7 ont été transfectées transitoirement par un mélange de 70% d'HBc (A), HBc-F97L (B) ou HBc-Y132A (C) et 30% de leurs dérivés fusionnés avec l'eGFP. Les cellules ont été triées par la fluorescence de l'eGFP et fixées avant inclusion en gélatine. Des sections ultrafines ont été coupées et les protéines taguées ont été marquées par un anticorps de lapin anti-eGFP et un anticorps secondaire anti-lapin conjugué à des billes de 10nm. Les capsides sont révélées par les flèches jaunes et rouges.

Il a été montré que l'HBc-Y132A pouvait être complémentée par la protéine sauvage afin de restaurer l'assemblage, aboutissant à la production de capsides instables (Packianathan et al. 2010). Ces études *in vitro* sont faites sur des protéines tronquées, sans leur domaine C-terminal, et dans des conditions salines particulières. Nous avons donc mené une expérience de complémentation en milieu cellulaire sur des protéines complètes et en utilisant le FLIM en tant qu'outil pour suivre l'oligomérisation (Figure 36). Les cellules sont transfectées avec 1.2 ou 0.4µg d'un mélange de plasmides contenant HBcY132A et ses homologues fluorescents eGFP et mCherry (dans les proportions précédemment décrites (Rat et al. 2020)) et respectivement 0.8 ou 1.6µg de plasmides exprimant l'HBcWT. L'efficacité de FRET dans ces conditions reste élevée pour la protéine sauvage (31.87±2.9%), ce qui montre ici une bonne oligomerisation (Figure 36, en jaune). Comme précédemment décrit, le mutant Y132A possède une plus faible efficacité de FRET de 13.88±2.27%, traduisant une altération de son oligomérisation (Figure 36, en bleu). La complémentation par 40% de protéines sauvages permet de restaurer partiellement l'efficacité de FRET avec une efficacité de 22.58±1.34% (Figure 36, en violet). L'utilisation de 80% de protéine sauvage semble améliorer cette efficacité, à 25.46±3.2% même si cela ne permet pas un retour complet à l'efficacité de la protéine sauvage (Figure 36, en magenta). Cette remontée d'efficacité FRET correspond à l'augmentation de la proportion d'HBcY132A-eGFP pouvant transférer leur énergie, sous entendant oligomérisées. Nous montrons ici qu'en dépit de l'altération de l'interaction inter-dimères induite par la mutation, HBcY132A pourrait s'oligomériser davantage lorsqu'elle est complémentée par l'HBcWT. Nous n'avons pas d'information exacte sur l'oligomérisation du mutant HBcY132A seul et complémenté, par conséquent il serait judicieux de compléter ce résultat par FCS.

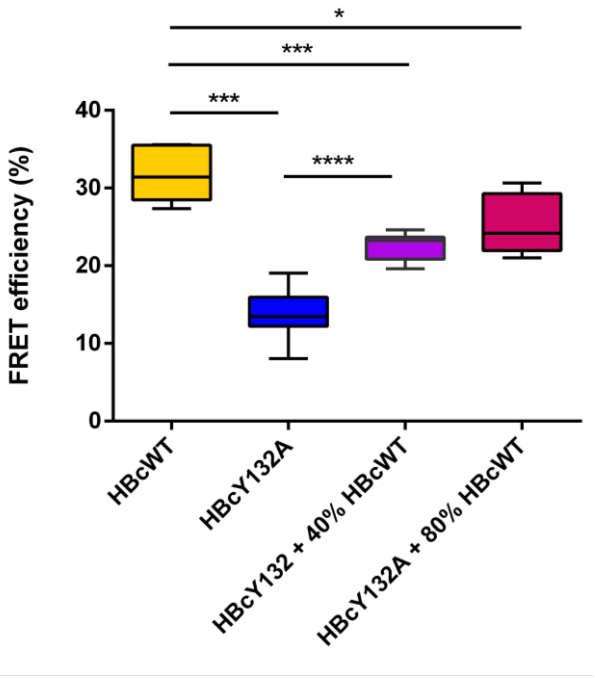


Figure 36 : L'efficacité de FRET est partiellement restaurée par la complémentation en protéine sauvage. En jaune et bleu : des cellules HuH-7 sont transfectées avec un mélange contenant respectivement l'HBcWT ou l'HBcY132A et leurs homologues fluorescents comme précédemment décrit (Rat et al. 2020). En violet et magenta : 1.2 et 0.4µg du mélange HBcY132A est complété avec respectivement 0.8 et 1.6µg d'HBcWT. Les boites à moustache des efficacités de FRET sont calculées en utilisant l'Eq_1. Un test de Mann-Whitney a été fait pour comparer ces valeurs. (* = $p<0.05$; *** : $p<0.001$ = **** = $p<0.0001$)

Finalement, l'association des outils de FLIM et de microscopie électronique nous a permis de suivre l'assemble de deux mutants ponctuels. Nous observons à nouveau une corrélation entre la diminution du temps de vie observée pour le mutant HBcY132A et le défaut d'assemblage. La complémentation de ce dernier avec des quantités graduelles d'HBcWT aboutit à une restauration partielle de l'oligomérisation observée par FRET. Néanmoins, nous ne savons pas, avec ces données, si cette augmentation correspond à la restauration de l'assemblage de la capside que l'on pourrait observer par MET. Il serait également intéressant de regarder par FCS si, dans ces conditions de complémentation, l'oligomérisation a lieu de manière aussi efficace que la protéine sauvage.

III. Etude de l'effet de la charge du domaine C-terminal sur l'assemblage

1. Introduction

En complément de ces travaux sur des mutants connus de la protéine core, nous nous sommes intéressés à une modification post-traductionnelle importante pour la modulation des fonctions de la protéine core : la phosphorylation. Les études faites *in vitro* ou encore en utilisant des techniques de biologies moléculaire, ont permis de conclure, par l'utilisation de mutants mimant la phosphorylation (E/D) ou empêchant cette phosphorylation (A) ou avec des kinases, que la phosphorylation ne prévenait pas l'assemblage mais d'autres fonctions comme l'encapsidation (Q. Zhao et al. 2018; Böttcher et Nassal 2018; Jung et al. 2014; J. Luo et al. 2020; Heger-Stevic et al. 2018; C. Chen, Wang, et Zlotnick 2011). Ce résultat reste surprenant car nos expériences de FLIM, et les résultats de la littérature, soulignent que la partie CTD est importante pour l'assemblage, probablement via une interaction avec les acides nucléiques (Ludgate et al. 2016; S. Wang et al. 2019; Rat et al. 2020). Comme la phosphorylation du CTD diminue l'interaction HBc-ARN (Su et al. 2016), nous avons tenté de suivre son effet sur l'assemblage avec notre méthode. Pour cela, nous avons construit des mutants de la protéine core et de ses dérivés fluorescents. Les mutants remplacent les sérines et thréonines, qui peuvent être phosphorylés, par des alanines (A), mimant l'absence de phosphorylation de par leur charge neutre, ou des acides glutamiques (E), mimétique partiel de la phosphorylation de par son statut chargé négativement dans la cellule. Les 7 résidus sérines/thréonines sont ainsi mutés par des alanines ou des acides glutamiques pour les mutants dénommés 7A ou 7E tandis que seuls les 3 sites majeurs de phosphorylation sont mutés pour les mutants 3A et 3E (S155, S162 et S170).

2. Présentation des résultats obtenus

Nous avons effectué des expériences de FLIM sur des cellules HuH-7 exprimant les protéines HBc3A, 3E, 7A ou 7E avec leurs homologues fluorescents eGFP et mCherry. Nous observons une efficacité de FRET pour la protéine sauvage qui est comparable à celle de tous les mutants. L'efficacité de FRET reste dans toutes les conditions très proches de la protéine sauvage, qui se situe entre 20 et 30% dans cette expérience. Ceci montre que la phosphorylation n'a également pas d'impact dans notre modèle d'assemblage suivi avec l'efficacité de FRET. Néanmoins, les résultats précédemment décrits sur le mutant de délétion de l'hélice 3 ont montré que, malgré un FRET élevé, ce mutant n'était pas capable de former des capsides. Une expérience de MET supplémentaire est donc nécessaire afin de compléter ce résultat. De plus

une expérience de micro-injection pourrait permettre de suivre la cinétique de l'assemblage de ces mutants, et d'exclure un effet concentration-dépendant.

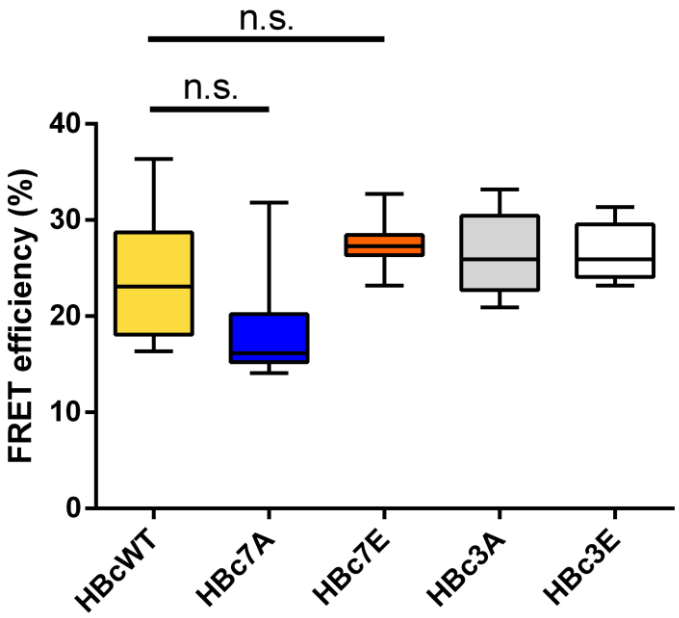


Figure 37 : Efficacité de FRET des différents mutants mimant la phosphorylation. Des cellules HuH-7 ont été transfectées avec HBc ou les dérivés et leurs homologues fluorescents comme précédemment décrit (Rat et al. 2020). Les mutants ont également été mesurés dans ces proportions. Un test t de Welch a été fait pour comparer les valeurs d'une centaine de cellules de 3 expériences indépendantes.

IV. Discussion sur l'assemblage de la capside du virus de l'hépatite B

L'assemblage de la capside du virus de l'hépatite B a jusqu'ici fait l'objet d'études principalement *in vitro* en produisant la protéine HBc ou ses dérivés en milieu bactérien. Ces études ont permis de décrire la structure de la protéine core (Wynne, Crowther, et Leslie 1999). Toutefois, les caractéristiques de cet assemblage d'HBc en capside et la localisation de cet assemblage n'avaient jamais été observées dans des lignées hépatocytaires. Dans ces travaux, nous avons investigué l'assemblage de la capside en cellules humaines HuH-7 en combinant le FLIM-FRET, FCS et MET. La combinaison de ces techniques d'imagerie moderne avait auparavant été utilisées afin d'imager l'assemblage d'HTLV, RSV ou HIV et pour quantifier l'interaction entre des partenaires viraux et cellulaires (El Meshri et al. 2015; Maldonado et al. 2017; Larson et al. 2003; Fogarty et al. 2014). Ces approches ont fourni des données qui ont révolutionné nos connaissances des changements dynamiques et structuraux impliqués pendant les cycles viraux tout comme dans d'autres champs de recherche en biologie (Larson et al. 2003).

En utilisant des tags fluorescents, nous montrons dans ces travaux que HBc/HBc-eGFP forme des capsides comparables aux capsides sauvages en cellules HuH-7 (Figure 31 et S1 de l'article). L'efficacité de FRET d'HBc-eGFP décrite dans nos expériences reste similaire à 24, 48 et 72h post-transfection. Cela suggère que l'oligomérisation de la core a lieu rapidement après l'expression et que les oligomères ne sont pas plus condensés lorsque la concentration en protéines augmente (Figure 28, (d)–(f)). Cette observation de l'oligomérisation sans changements structuraux majeurs au cours du temps est cohérente avec la distribution homogène des tailles de particules retrouvées dans les données de FCS (Figure 30, (f)). La brillance moyenne de 26.4 fois la brillance d'une seule eGFP correspond à un nombre moyen d'HBc par oligomère d'entre 170 et 230 (en considérant l'expression d'HBc non fluorescente). Ce nombre moyen est cohérent avec les 180 ou 240 copies d'HBc (dépendamment des symétries T = 3 ou T = 4) retrouvés dans les capsides du VHB (Wynne, Crowther, et Leslie 1999; Crowther 1994) et correspond aux capsides morphologiquement comparables aux capsides natives observées en microscopie électronique (Figure 31, (a)), malgré l'absence des autres protéines virales dans nos expériences. L'assemblage de la capside est par conséquent indépendant des autres facteurs viraux.

Nous avons ensuite utilisé l'analyse de la brillance par des mesures de FCS nous permettant de discriminer les monomères des oligomères, de mesurer la courbe de fixation pendant l'assemblage et de déterminer un K_d apparent de 0.7-0.8µM pour l'assemblage de la

capside du VHB (Figure 30, (g)). De façon intéressante, l'utilisation de la brillance pour la mesure des interactions protéiques dans des cellules vivantes a déjà été utilisée pour calculer l'auto-assemblage de récepteurs nucléaires avec un K_d apparent de quelques µM (Yue et al. 2021). De façon similaire, la concentration de Gag chez l'HTLV et le VIH nécessaire pour former des particules en cellules vivantes déterminée par analyse de la brillance correspond à environ 0.5µM (Fogarty et al. 2011), avec une stœchiométrie pour le VIH allant de 750 à 2500 copies de protéines par particule (Y. Chen et al. 2009). Cela est en accord avec la taille plus grande du VIH comparée au VHB. Tous ces résultats illustrent que l'analyse de la brillance fournit des détails sur les complexes moléculaires dans les cellules qui auraient été difficile à obtenir avec d'autres techniques.

Dans ce travail, une grande quantité d'HBc a été observée dans le noyau (Cf. Article, Fig. 2) en contraste avec le marquage d'HBc dans des cellules réplicatives (Deroubaix et al. 2015). Dans nos conditions où HBc est exprimée seule en cellules HuH-7, son CTD est probablement phosphorylé et la capside du VHB est vide d'acides nucléiques avec une exposition partielle du CTD à l'extérieur de la capside (Cf. Partie Données bibliographiques II.4.4.3.). Par conséquent, le NLS situé dans le CTD est disponible pour l'import nucléaire pour favoriser l'accumulation d'HBc dans le noyau, au sein duquel HBc interagirait avec de nombreuses protéines (Chabrolles et al. 2020). HBc possèderait également *via* ses ARD très chargés positivement une capacité à se lier aux acides nucléiques (Hatton, Zhou, et Standring 1992). Par ailleurs, nos résultats montrent aussi que les protéines HBc du noyau sont assemblées en capsides. En effet, nous avons observé par FRET et FCS que l'HBc sauvage s'oligomérise efficacement (Figure 29 et 30 (a) et (e)) et que les oligomères sont distribués de manière homogène dans toute la cellule (Figure 28). Ce résultat montre que l'assemblage de la capside du VHB n'est pas restreint à un compartiment cellulaire, comme il a pu être décrit pour les rétrovirus à la membrane plasmique (Sundquist et Krausslich 2012). Par ailleurs, aucune différence significative en terme d'efficacité de FRET ou de mesure en FCS n'a été observée dans le noyau par rapport au cytoplasme, malgré le fait que le désassemblage de la capside soit proposé pour son entrée dans le noyau (Rabe et al. 2009).

En contraste avec l'HBc sauvage, nous avons observé que HBc-NTD ne formait que des petits oligomères (Figure 29, 30) qui ne s'assemblent pas en capsides (Figure 31). La faible oligomérisation d'HBc-NTD est retrouvée à tous les temps post-transfection analysés (Figure 29), et donc l'oligomérisation n'est pas restaurée par une concentration plus élevée de protéines. En effet, aucune oligomérisation n'a été trouvée, et ce jusque 6 à 7µM de protéines HBc-NTD

fluorescentes (Figures 30, (g), 31). De manière intéressante, l'HBc-NTD produite dans des concentrations millimolaires en E. coli est capable de former des capsides (Kratz, Bottcher, et Nassal 1999; Yoo et al. 2012). Toutefois, dans les conditions plus physiologiques que nous utilisons dans ces travaux, aucune capside n'a été détectée avec l'HBc-NTD taguée, ce qui souligne le rôle essentiel du CTD dans la morphogenèse de la capside du VHB.

L'incapacité d'HBc-NTD à former des capsides produites à partir de lysats de réticulocytes de lapin et de germes de blés a été rapportée (Ludgate et al. 2016; S. Wang et al. 2019). Nos analyses confirment et étendent ces observations en utilisant des méthodes quantitatives. Comment expliquer la différence importante entre HBc et HBc-NTD en contexte cellulaire ? Tout d'abord, la concentration : il est possible que l'absence d'assemblage de la capside avec l'HBc-NTD en milieu cellulaire résulte d'une faible concentration de protéines exprimées, puisque HBc-NTD a été montrée comme capable de s'assembler *in vitro* une fois purifiée avec une K_d apparent de 15µM à 0.15M de NaCl.

Alternativement, la stabilisation par interaction avec des ARN pourrait avoir un rôle : il a longtemps été suspecté que le domaine C-terminal facilitait la formation de capsides natives, probablement via des interactions spécifiques et non spécifiques avec l'ARN (Ludgate et al. 2016; S. Wang et al. 2019; Patel et al. 2017; Adam Zlotnick, Porterfield, et Wang 2013). Il est également tentant d'imaginer un mécanisme de titration des charges positives d'HBc par des ARN de transfert. En effet, des travaux montrent la présence d'ARNt dans des capsides produites en cellules humaines (HEK-293)(Ludgate et al. 2016). Le détournement des ARNt par des facteurs viraux a également été décrite pour le VIH (Bou-Nader et al. 2021, 1). Toutefois, lorsqu'HBc est exprimé seul en cellules HuH-7, le CTD est probablement phosphorylé et les capsides vides d'acides nucléiques (Su et al. 2016). De plus nos expériences sur les mutants mimant ces phosphorylations via l'ajout de charges négatives par l'acide glutamique suggèrent que l'oligomérisation n'est pas altérée par l'ajout de charges (Figure 37). Il est important de noter que malgré la mimique partielle de la phosphorylation utilisée pour nos mutants, la phosphorylation permet l'addition de 2 charges négatives tandis qu'ici l'acide glutamique n'en ajoute qu'une. De plus, la sérine et l'alanine possèdent une structure différente et il est possible que l'oxygène non phosphorylé puisse avoir d'autres mécanismes d'action, comme notamment la formation de liaisons hydrogènes. Quoiqu'il en soit, il serait judicieux de suivre cet assemblage de façon très précoce après micro-injection de plasmides afin de pouvoir discriminer un potentiel effet concentration-dépendant pour ces mutants. Enfin, les résultats qui

seront décrits plus tard dans ce manuscrit montrent par colocalisation dans les mêmes cellules, que la capside n'interagit que très faiblement avec l'ARN viral également.

Enfin, il est possible que ces différences observées entre HBc et HBc-NTD soient dues à un défaut d'interaction protéines-protéines. Un premier mécanisme est proposé, médiée par des interactions électrostatiques, qui permettraient de stabiliser la capside (Heger-Stevic et al. 2018; Selzer et al. 2015). De plus, il est connu que le CTD interagit avec la protéine SRPK, et il est proposé qu'en plus de participer à la phosphorylation, SRPK puisse agir en tant que chaperonne potentielle qui faciliterait l'assemblage du VHB (C. Chen, Wang, et Zlotnick 2011). Le fait qu'une protéine virale puisse détourner les protéines chaperonnes cellulaires a été montré par d'autres virus de plantes ou d'animaux (Dokland 1999).

Afin de confirmer que les mesures de microscopie quantitative de fluorescence sur l'HBc-eGFP exprimé en cellules vivantes est un outil efficace pour l'étude de l'assemblage d'HBc, nous avons délété deux domaines différents de la protéine afin de suivre leurs effets sur l'assemblage de particules de core. La troisième hélice, en association avec la quatrième hélice, appartient à une protrusion en épingle à cheveux à la surface des capsides. Les dimères d'HBc sont stabilisés par les contacts étroits avec l'hélice 3 de chaque monomère, et de façon minoritaire avec l'hélice 4 (Wynne, Crowther, et Leslie 1999; König, Beterams, et Nassal 1998). Nous avons par conséquent étudié le mutant de délétion de l'hélice 3. La dépendance au temps et à la concentration de ce mutant (Figure 28 et 29) montre que malgré la faible interaction entre les protéines, celles-ci peuvent s'oligomériser sans la majorité des résidus impliqués dans l'interface intra-dimère. Il est ainsi possible que cet assemblage soit permis par l'interaction entre les dimères via la région 124-135, qui, comme nos résultats ont pu le montrer, est essentielle pour l'oligomérisation via des contacts inter-dimères (Figure 28, 29, 30) (Wynne, Crowther, et Leslie 1999). Cet assemblage est néanmoins incorrect et n'aboutit pas à la formation de capsides observées par microscopie électronique (Figure 31). De manière cohérente, l'utilisation du mutant HBcY132A aboutit à une altération de cette oligomérisation (Figure 34) et à un défaut d'assemblage (Figure 35, (c)) qui pourrait être restauré par la complémentation en protéines sauvages (Figure 36). Ce mutant nous permet également de confirmer qu'en milieu cellulaire le résidu Y132 est important pour l'interface inter-dimères, comme il précédemment été décrit (C. R. Bourne et al. 2009; Y. Luo et al. 2021). Inversement, la mutation F97L n'aboutit pas à une diminution de cette oligomérisation (Figure 34), et permet la formation de capsides morphologiquement comparables à HBcWT (Figure 35, (b)), en

cohérence avec la littérature (Böttcher et Nassal 2018). Finalement ces travaux nous ont permis de faire une relation structure-activité qui valide bien les études *in vitro*.

En conclusion, les connaissances apportées par ces travaux fournissent un nouvel aperçu décrivant le comportement spatio-temporel de la protéine HBc. Le FRET et la FCS ont permis de suivre l'assemblage d'HBc, tandis que la MET a permis l'observation de capsides du VHB. Nous avons montré que l'assemblage avait lieu efficacement à de faibles concentrations de protéines, indépendamment de sa localisation cellulaire. La délétion du CTD empêche l'assemblage, qui n'est pas restauré en augmentant la concentration en protéines. Ces résultats sont importants pour l'analyse de processus impliqués dans l'oligomérisation d'HBc comme le rôle de protéines de l'hôte agissant en tant que chaperonnes et régulant l'assemblage de la capside virale (C. Chen, Wang, et Zlotnick 2011). Des travaux suggèrent une régulation de l'enveloppement par deux conformations A et B, que nous pourrions étudier par microscopie quantitative en milieu cellulaire. Il serait plus particulièrement intéressant d'étudier les mutants P5W et L60W qui ont été décrits par Lecoq et al. comme étant importants dans la conformation de la capside, uniquement isolés dans la conformation B *in vitro* (Lecoq et al. 2021). Les questions sous-jacentes à cette étude seraient de savoir si nous pourrions détecter ces conformations en milieu cellulaire, si celles-ci peuvent l'être par nos outils. Enfin, nous utiliserons notamment ces outils dans l'étude de CpAMs (Partie 3.II).

Partie 2 : Etude de la formation du complexe tripartie formé par la core, l'ARN pré-génomique et la polymérase

1. Introduction

L'assemblage des protéines de capside ayant été étudié par une approche de microscopie, notre étude s'est ensuite focalisée sur une autre fonction majeure d'HBc à savoir l'encapsidation de l'ARN. En effet, si cette encapsidation a déjà été partiellement étudiée par des approches biochimiques, la localisation de cette interaction dans la cellule ainsi que de nombreux paramètres comme la stœchiométrie, la présence ou non de Pol, le rôle de l'assemblage, de l'allostérie ou de la phosphorylation restent peu décrits en milieu cellulaire.

L'ARN pré-génomique est le support de la transcription inverse mais également de la traduction des protéines Pol et Core. Ainsi, la polymérase est capable d'interagir avec le domaine ε de l'ARNpg via son domaine TP. C'est ce complexe qui est encapsidé (Lott et al. 2000; S. A. Jones et al. 2012; Shin, Park, et Ryu 2011). Néanmoins l'interrelation des trois partenaires entre eux est peu connue. De plus des régions conservées de l'ARN pré-génomique interagissant potentiellement avec la core appelés PS (packaging signals) ont été étudiées. Ces régions ont été découvertes par SELEX, et leur rôle potentiel n'a été étudiée que par des méthodes biophysiques (Patel et al. 2017). L'objectif de cette partie est par conséquent de s'atteler à la description de la morphogenèse de ce complexe tripartite.

Cette étude est prévue en trois étapes, La détection de l'ARN, l'observation d'un phénotype propre à l'interaction Core-ARN-Pol, et la comparaison de ce phénotype avec différents mutants d'HBc et de l'ARNpg.

2. Présentation des résultats obtenus

2.1.Détection de l'ARN pré-génomique

Nous avons tout d'abord utilisé la technologie MS2 qui, brièvement, consiste en la reconnaissance d'un ARN dans lequel des tiges-boucles sont insérées par une protéine MS2-NLS-eGFP. Cette technologie est déjà utilisée au laboratoire mais ne nous a néanmoins pas permis de détecter l'ARN pré-génomique. Nous nous sommes donc tournés vers l'Hybridation *In Situ* en Fluorescence, ou FISH. La détection de l'acide nucléique est rendue possible par l'utilisation d'un set d'une vingtaine de sondes fluorescentes. Nous avons donc utilisé des séquences dirigées contre la région non redondante de la core et le début de la polymérase afin de détecter l'ARNpg. Des cellules HepAD38 ont été marquées par FISH afin de révéler l'ARNpg (Figure 38). L'observation par microscopie confocale a révélé essentiellement

quelques marquages punctiformes au sein des noyaux alors que, dans la littérature, le marquage est décrit comme étant nucléocytoplasmique, avec une quantité de signaux plus élevée (Yue et al. 2021; Unchwaniwala, Sherer, et Loeb 2016). Cette différence pourrait s'expliquer par un manque de sensibilité de notre technique de smFISH ou encore une faible production d'ARNpg dans les cellules HepD38. Par conséquent nous avons essayé de détecter l'ARNpg en cellules HuH-7 transfectées par le plasmide pHBV1.1.

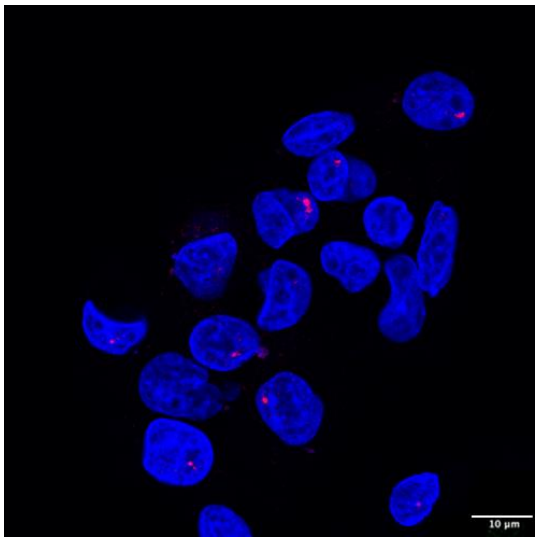


Figure 38 : Observation par microscopie confocale de l'ARNpg après marquage par FISH de cellules HepAD38. Des cellules HepAD38 ont été marquées par FISH avant observation par microscopie confocale. Cette image correspond à la superposition du canal bleu (noyau) et rouge (ARNpg).

Des cellules HuH-7 ont donc été transfectées par un plasmide exprimant la totalité des facteurs viraux (pHBV1.1) et marquées par smFISH 24h post-transfection. Les cellules transfectées sont alors observées par microscopie confocale et présentent un phénotype punctiforme de l'ARNpg dont la localisation est très hétérogène (Figure 39, (a)). Plus en détails, nous observons plusieurs phénotypes de l'ARNpg : tout d'abord, nous observons des localisations parfois uniquement cytoplasmiques (Figure 39, (a), flèche blanche), ou uniquement nucléaires (Figure 39, (a), flèche verte), d'autres fois avec la présence de marquages dans les deux compartiments mais avec une majorité de signaux nucléaires (Figure 39, (a), flèche orange), ou une majorité de signaux cytoplasmiques (Figure 39, (a), flèche jaune). Afin de vérifier la spécificité du marquage pour l'ARN, des cellules ont été transfectées par le pHBV1.1, fixées 24h post-transfection puis traitées avec de la RNAse A avant le marquage par FISH (Figure 39, (b)). Les cellules traitées par la RNAse A ne montrent aucun marquage

comparable à la condition sans RNAse, ce qui confirme que les marquages correspondent à des ARN. Les cellules HuH-7 ont ensuite été tranfectées par un pcDNA3 vide avant d'être marquées et aucune fluorescence correspondante aux sondes n'est détectée, ce qui confirme ici que les ARN cellulaires mais également la méthode de transfection n'induisent pas de marquages aspécifiques de l'ARNpg (Figure 39, (c)).

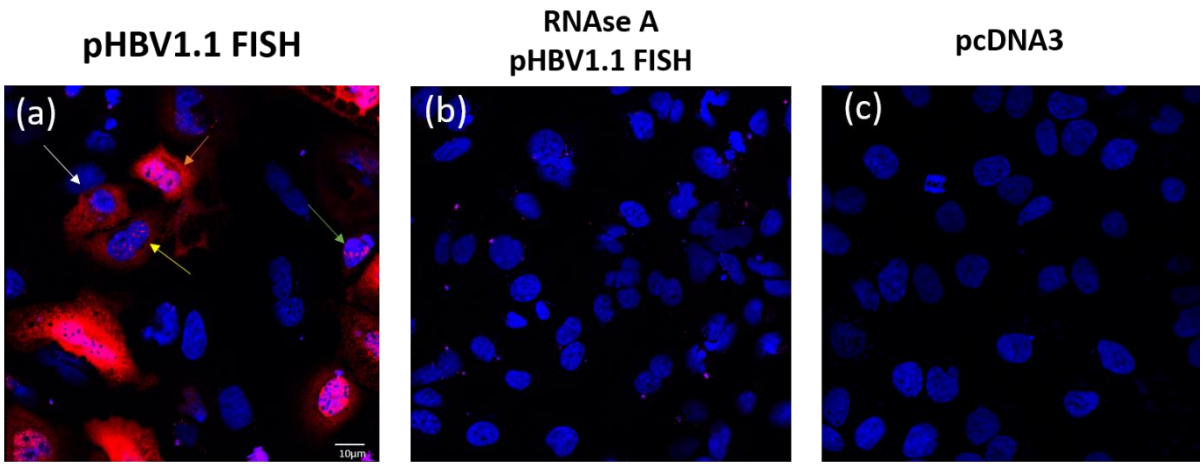


Figure 39 : Observation par microscopie confocale de l'ARNpg du VHB en cellules HuH-7 transfectées. (a) Les cellules sont HuH-7 sont transfectées avec le pHBV1.1 avant d'être préparées par FISH pour observation en microscopie confocale. (b) Les cellules Huh-7 sont transfectées avec le pHBV1.1 puis fixées et traitées par de la RNAse A avant leur marquage par FISH. (c) Les cellules HuH-7 sont transfectées par un plasmide pcDNA3 vide avant leur marquage par FISH. Ces images correspondent à une superposition du canal bleu (noyau) et du canal rouge (ARN). Les différents phénotypes observés dans la condition (a) sont identifiés par des flèches.

2.2.Détection de l'interaction entre la core et l'ARN pré-génomique.

A la suite de ces expériences qui ont permis de détecter l'ARNpg, la colocalisation entre la protéine Core et l'ARNpg a été recherchée. Nous avons donc effectué diverses expériences de FISH et d'immunofluorescence combinées (Figure 40). Les protéines HBc sont détectées dans le canal vert et les ARN dans le canal rouge et seule une image superposée avec le canal bleu (noyau) est ici montrée. Nous avons pu observer des cellules avec une colocalisation très partielle de l'HBc et de l'ARNpg (Figure 40, II) et en parallèle d'autres cellules avec une absence de colocalisation (Figure 40, I). Cette colocalisation partielle a été mesurée par des coefficients de Pearson dans le volume colocalisé et correspond à 0.124 ± 0.09. Nous avons ensuite entrepris de changer les conditions pour augmenter cette colocalisation. D'autres types lignées hépatocytaires ont été testées (HuH-7, HepG2, HuH-7.5), avec différents plasmides

(pHBV1.1, pHBV1.5, pHBV1.1ΔC + pHBc-WT), et différents temps post transfection (8-72h). Une des raisons de cette absence de co-localisation aurait pu être la transcription inverse de l'ARNpg en ADN qui ne serait alors pas détecté par notre technique de FISH. Nous avons donc testé sans succès le plasmide pHBV1.5polY63- dont la mutation Y63 en F63 inhibe la transcription inverse. Par ailleurs, diverses modifications du protocole de marquage par immunofluorescence et smFISH ont été faites, le marquage simultané, le marquage en séquentiel, en utilisant différents réactifs de perméabilisation (Ethanol froid 70°, Triton 0.1%, Triton 1%) et différents temps d'incubation avec la sonde (4 à 16h) sans amélioration notable de cette colocalisation (non montrés).

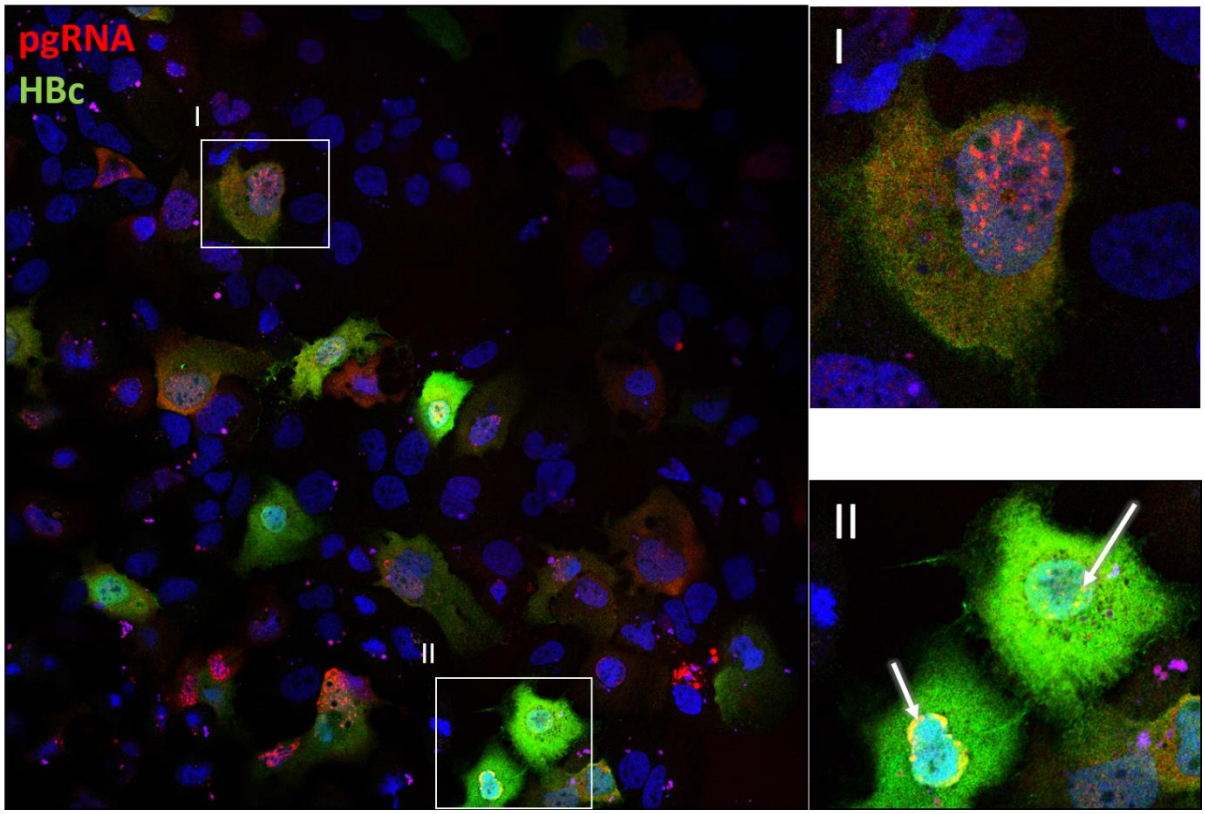


Figure 40 : Colocalisation de la protéine core et de l'ARNpg observée par immunofluorescence et FISH. Des cellules HuH-7 ont été transfectées avec le plasmide pHBV1.1 puis préparées par immunofluorescence et FISH avant observation par microscopie confocale. Ces images correspondent à une superposition du canal bleu (noyau), vert (HBc) et rouge (ARNpg). L'image à gauche correspond à une image mosaïque de 9 images fusionnées. Les encarts situés à droite contiennent des cellules comprenant une absence de colocalisation visible (I) ou une colocalisation partielle identifiée par des flèches blanches (II).

Ces résultats pourraient s'expliquer par la faible proportion de capsides contenant des acides nucléiques. Plusieurs travaux mettent en évidence une majorité de capsides vides dans les *sera* de patients et en lysats de cellules HepG2 (Ning et al. 2011; Luckenbaugh et al. 2015; Alberti et al. 1978; Kaplan et al. 1976).

Nous avons donc voulu augmenter le contraste pour aller étudier ces faibles proportions en utilisant la split-eGFP (Foglieni et al. 2017; Cabantous et al. 2013; Cabantous, Terwilliger, et Waldo 2005). Elle repose sur la séparation de l'eGFP en plusieurs fragments qui sont ensuite fusionnés avec les protéines d'intérêts. Si celles-ci sont à proximité les unes des autres alors l'eGFP se reconstitue et fluoresce.

Nous avons obtenu les plasmides de Cabantous et al. (Cabantous, Terwilliger, et Waldo 2005) contenant les séquences GFP 1-10 et GFP11 puis avons cloné l'HBc-CTD-11 et l'HBc-c/e1-11. Ces plasmides expriment la protéine core taguée par la partie 11 de l'eGFP, à l'extrémité C-terminale ou bien sur l'épitope c/e1. Nous avons alors transfecté des HuH-7 avec un mélange de plasmides exprimant HBc-CTD-11 et eGFP1-10 (Figure 41, (b)) ou avec un mélange de plasmide exprimant HBc-c/e1-11 et eGFP1-10 (Figure 41, (c)). Les images obtenues ont été comparées avec des images de cellules exprimant uniquement HBc révélée par un anti-HBc (Figure 41, (a)) ou n'exprimant que l'eGFP1-10 ou les dérivés d'HBc (non montré) qui n'expriment pas de fluorescence. Nous observons dans les images (b) et (c) que l'eGFP est capable de se reconstituer et que sa localisation est comparable à l'HBc-WT marquée par immunofluorescence. L'insertion du fragment 11 dans le partie c/e1 ou à l'extrémité C-terminale présentent tous les deux des phénotypes punctiformes avec une répartition nucléocytoplasmique.

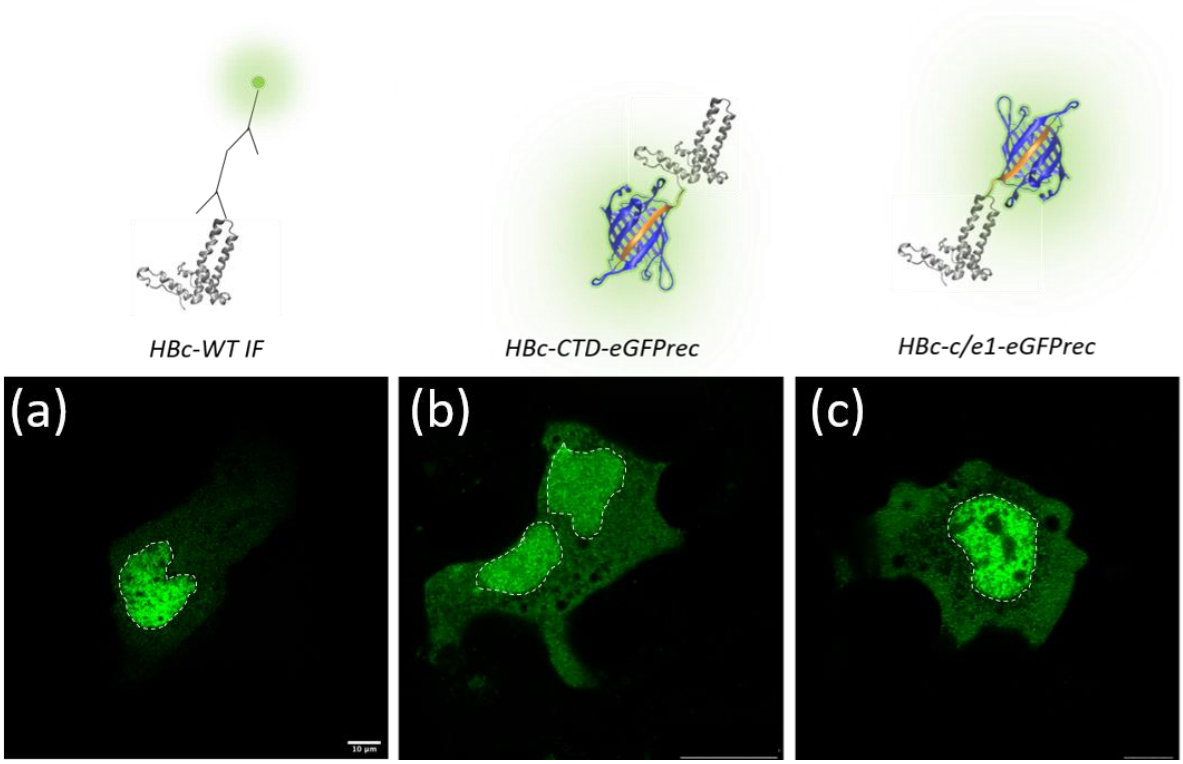


Figure 41 : Reconstitution de l'eGFP fusionnée à la core par BiFC. Les cellules HuH-7 sont transfectées par un plasmide exprimant l'HBc-WT (a) ou un mélange de plasmides exprimant l'HBc-CTD-11 et l'eGFP 1-10 (b) ou l'HBc-c/e1-11 et l'eGFP 1-10 (c) à un ratio 0.5/0.5µg. Les cellules sont fixées puis une immunofluorescence est faite sur les cellules transfectées avec le plasmide codant pour la protéine sauvage (a). Les cellules sont alors observées au microscope confocal et les images ci-dessus sont représentatives des phénotypes obtenus. Les noyaux sont visualisés par les pointillés gris. Des schémas représentant la localisation de l'eGFP-11 dans la core sont placés au-dessus des images correspondantes. La partie bleue de la GFP correspond à la partie 1-10 tandis que la partie orange correspond à la partie 11, fusionnée à la protéine core.

Cependant, les deux fragments GFP1-10 et GFP11 sont capables de s'associer spontanément et par conséquent ne dépendent pas de l'interaction entre les protéines qui y sont attachées, mais d'une localisation commune. Cette application aurait pu être utilisée pour étudier l'ARN, néanmoins notre étude porte sur une interaction entre l'ARNpg et core (médiée par la polymérase).

Afin de démontrer une interaction entre l'ARNpg et la protéine core, il a été nécessaire de nous intéresser à la TiFC (Trimolecular Fluorescence Complementation, Complémentation trimoléculaire de fluorescence). Ici, l'eGFP est divisée en trois parties : 1-9, 10 et 11. D'après les résultats du groupe de V. Cabantous une interaction entre les partenaires d'intérêt est

nécessaire pour reconstituer la GFP (Pedelacq et Cabantous 2019; Cabantous et al. 2013). Nous réutilisons la technologie MS2 pour marquer l'ARNpg avec la protéine MS2 taguée par le fragment 10 de la GFP. Cette protéine est capable de reconnaitre les tiges-boucles MS2 que nous avons inséré dans l'ORF de la polymérase d'un plasmide exprimant toutes les protéines virales. Par conséquent, l'ARNpg contient ces tiges-boucles, qui sont alors reconnues par la protéine MS2. Afin d'étudier l'interaction avec la core nous avons placé le fragment 11 de la GFP au niveau de l'épitope c/e1 de la protéine core. La MS2-eGFP10, la core-11 (HBc-eGFPc/e1) et la GFP 1-9 apportée en trans seraient alors, en théorie, capables de reconstituer une GFP complète, fluorescente (Figure 42). La fluorescence serait alors synonyme d'une interaction entre les partenaires.

Des cellules HuH-7 ont donc été transfectées par un mélange de 5 plasmides exprimant : la MS2-eGFP10, l'HBc-eGFP11c/e1, et la eGFP 1-9 nécessaire pour la reconstitution de la GFP, mais également l'ARN qui est exprimé par le pHBV1.1ΔCMS2 et la polymérase qui est nécessaire pour l'interaction (non montré). Ces cellules ont été fixées puis observées par microscopie confocale. Néanmoins, aucun signal fluorescent n'a été observé. Cette expérience a également été répétée en intervertissant les fragments entre la core et la MS2, mais également en plaçant le fragment de la core au niveau de son extrémité C-terminale. Cependant, aucune de ces expériences n'a abouti à l'émission de fluorescence.

Finalement, ces expériences qui ont été menées à la fin des travaux de thèses doivent être complétées. Nous ne savons pas avec les données que nous possédons à l'heure actuelle, si ce manque de fluorescence est dû à un manque de concentration, qui pourrait être pallié par une augmentation du temps d'expression, ou encore à un phénomène dépendant de la lignée cellulaire. D'autres explications à ce défaut de reconstitution de la GFP peuvent être proposées : les différentes parties peuvent ne pas être suffisamment proches pour pouvoir reconstituer la GFP, ou encore l'orientation des différents fragments ou leur conformation peuvent ne pas être propice à cette reconstitution.

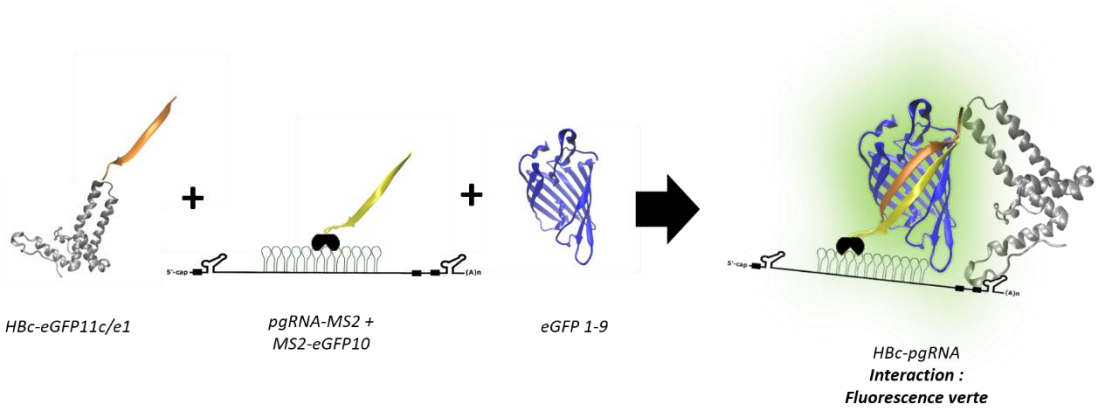


Figure 42 : Schéma théorique du fonctionnement de la TiFC pour l'étude de l'interaction HBc-ARNpg. L'association du fragment 11 apporté par la core, du fragment 10 apporté par la protéine MS2, en interaction avec l'ARN, et du fragment 1-9 permettraient la reconstitution de la GFP qui fluoresce uniquement lorsque les partenaires sont en interaction.

En conclusion, au cours de cet axe de recherche nous avons pu mettre en évidence un phénotype très hétérogène de l'ARNpg (Figure 39, (a)), et confirmer la faible proportion de capsides vides relatée par la littérature (Figure 40). Ce facteur a été un obstacle important, qui, avec la poursuite de ces travaux, pourrait être passé par l'utilisation de technologies plus performantes comme le FISH à ADN branché ou l'étude de l'ADNrc encapsidé.

Discussion sur l'étude des interactions entre la core et l'ARNpg.

Nous avons débuté cet axe de recherche afin de compléter les connaissances actuelles sur la formation du complexe tripartite composé de core, pol et de l'ARN pré-génomique. Il est connu, brièvement, que la polymérase s'associe avec la structure secondaire ε de l'ARNpg via sa tyrosine 63 et ce complexe serait encapsidé dans des d'intermédiaires de la capside (Lott et al. 2000; S. A. Jones et al. 2012; Shin, Park, et Ryu 2011). Les connaissances actuelles sont néanmoins limitées et l'étude par microscopie permettrait d'identifier la localisation et les cinétiques de formation du complexe. Cet axe se décompose en trois parties : la détection de l'ARN pré-génomique, la détection d'une proximité traduisant l'interaction indirecte entre la core et l'ARN pré-génomique, et un dernier axe qui n'a pas été commencé et qui aurait été la description des mécanismes d'interaction et d'encapsidation du complexe tripartite.

Pour détecter l'ARN pré-génomique, nous avons tout d'abord utilisé une approche utilisant la technologie MS2. Cette approche est basée sur la reconnaissance de l'ARN pré-génomique, dans lequel nous avons inséré des tiges boucles MS2, par la protéine MS2-eGFP (Querido et Chartrand 2008). Néanmoins elle s'est avérée infructueuse principalement à cause d'un manque de relocalisation cytoplasmique de la MS2-eGFP en présence de l'ARNpg. A la suite de ces résultats nous avons voulu détecter l'ARNpg en utilisant une approche d'hybridation *in situ*, le smFISH (Raj et al. 2008). Cette technique permet la détection d'ARN et a déjà fait ses preuves dans de nombreuses études de colocalisation, par exemple chez le virus de la grippe ou le virus sindbis (Garcia-Moreno et al. 2019; Chou et al. 2013). Cette technique ne semble néanmoins pas suffisamment sensible pour détecter l'ARNpg des HepAD38 contrairement aux résultats très récents utilisant la technique de FISH par ADN branché dans la littérature (Yue et al. 2021) (Figure 38). Au cours de nos travaux, les HepAD38 pourraient ne pas produire suffisamment d'ARNpg pour pouvoir le détecter par smFISH. Le FISH par ADN branchés permet d'amplifier les signaux de fluorescence, et est proposé comme une méthode alternative permettant une meilleure détection (Kwon 2013). Nous pourrions donc utiliser cette technologie pour nos études core-ARNpg en HepAD38. Toutefois, nous détectons l'ARNpg en cellules HuH-7 transfectées et le phénotype que nous observons est punctiforme (Figure 39, (a)). Nous retrouvons des phénotypes cohérents avec ceux obtenus dans la littérature (Unchwaniwala, Sherer, et Loeb 2016; Yue et al. 2021).

Malgré une bonne détection, sa colocalisation avec la protéine core est faible (Figure 40), et ce même en utilisant un plasmide défectif pour la transcription inverse (Non montré). Les résultats ainsi obtenus sont difficilement utilisables pour la comparaison de mutants de core

et l'étude de leur interaction avec l'ARNpg. En effet, chez l'Homme, seulement 1% des particules sériques contiennent de l'ADN. Des travaux ont ainsi montré qu'il existait dans le sérum de patients, deux populations dont une avec une densité plus faible dans les sérums de patients (Alberti et al. 1978; Kaplan et al. 1976). Ces virions de densité plus faibles sont des virions dénués d'acide nucléiques, représentant 99% des particules sécrétés contre 1% de virions contenant du génome viral (Ning et al. 2011; Luckenbaugh et al. 2015). Une étude a montré par microscopie électronique sur des lysats de cellules HepG2 transfectées par un plasmide codant pour le VHB qu'environ 90% des capsides étaient en réalités vides (Ning et al. 2011). Enfin, un faible nombre de protéine core interagirait avec la polymérase, ce qui est en concomitance avec la faible encapsidation du complexe ARNpg-Pol (Lott et al. 2000). Finalement, nous confirmons par nos expériences qu'une grande majorité des protéines de capside n'interagiraient pas avec le complexe pol-ARNpg.

Une équipe a récemment étudié la relation entre la protéine core et l'ARN pré-génomique par microscopie en cellules HepAD38 et HepG2-NTCP infectées (Yue et al. 2021). Malgré une bonne détection de l'ARNpg, les auteurs observent une faible colocalisation. Afin d'étudier la relation core-ARNpg, ils redéfinissent donc la colocalisation comme étant une distance inférieure à 500nm, très loin de la distance attendue pour la formation d'un complexe nucléoprotéique formant un rayon de 30-40nm.

Outre l'étude de la colocalisation entre la core et l'ARNpg, une alternative à l'étude du rôle de la core dans l'encapsidation serait la détection des complexes core-ADNrc. En effet, l'ADNrc est, quant à lui, le produit de l'ARNpg. Par conséquent, il serait intéressant d'étudier, de façon indirecte, cette encapsidation et sa localisation par l'utilisation de FISH ADN (Zhang et al. 2017). L'ADN pourrait être détecté après dénaturation *via* l'utilisation d'une sonde d'environ 1kb.

Partie 3 : Etude de modulateurs allostérique de l'assemblage de la capside du virus de l'Hépatite B

I. Etude d'un inhibiteur de classe I : Le BAY 41-4109

1. Introduction et présentation des résultats

En collaboration avec le Dr. Testoni B. et le Pr. Zoulim F., l'inhibiteur BAY-41-4109 a fait l'objet d'un travail de description phénotypique en microscopie confocale et électronique. Cet inhibiteur est une molécule de tête pour les inhibiteurs CpAMs de **classe II**. Des auteurs tels que le Dr. Deres ont montré son potentiel antiviral très tôt et de nombreuses molécules ont pu en être dérivés (Deres et al. 2003). Rapidement, deux classes d'inhibiteurs ont pu être dégagées, la première provoquant la formation de capsides vides et la seconde induisant l'assemblage *in vitro* de capsides incorrectement fermées, en « coquille d'œuf brisée ». Des travaux ont alors mis en évidence la capacité des inhibiteurs de **classe II** à induire la formation d'agrégats de protéine core en milieu cellulaire. En utilisant un dérivé, le BAY 38-7690, des auteurs ont observé, à fortes concentrations, la formation d'agrégats de protéine core localisés de façon prédominante dans le noyau, associés aux corps nucléaires de leucémie promyélocytique (Huber et al. 2018). D'autres auteurs ont observé que l'utilisation de BAY 41-4109 sur des durées élevées (6 jours), aboutissait en cellules à la formation d'agrégats, localisés dans le noyau (Corcuera et al. 2018). Inversement, des travaux utilisant une HAP-TAMRA, fluorescente, montrent une localisation cytoplasmique à faible concentration et en utilisant des durées de traitement courtes (Nair et al. 2018). La structure de ces agrégats a été décrite i*n vitro,* après production en bactérie et purification. Les différents auteurs s'accordent à dire que le traitement de la core par des inhibiteurs de type HAP conduisent à des capsides malformées. Cependant la résolution des images ne permettait pas de correctement localiser ces agrégats ni d'analyser leur structure en milieu cellulaire. Nous nous sommes intéressés à l'effet des HAP en nous focalisant sur la localisation de ces agrégats et sur leur structure à de plus faibles temps de traitements et concentrations.

Dans nos travaux nous avons suivi l'effet des CpAMs de **classe II** en utilisant l'inhibiteur BAY 41-4109 sur des cellules HuH-7 transfectées avec un plasmide exprimant la protéine HBc. 6h après la transfection, les cellules ont été traitées en utilisant différentes conditions, puis fixées et la protéine core a été révélée par immunofluorescence. Les traitements ont donc été effectués à différentes concentration (0, 0.1, 0.5, 1 et 5µM) en utilisant différents temps de traitement (24, 48 et 72h) (Figure 43, A).

Nous observons tout d'abord à 24h un phénotype punctiforme majoritairement nucléaire classiquement observé pour la protéine core en absence de BAY 41-4109, et ce de façon

inchangée à 48 et 72h (Figure 43, A, (a), (f) et (k)). Les aires des signaux de fluorescence ont été mesurées et converties en cercles de même aire. Le diamètre de ces cercles est alors utilisé pour étudier la proportion des agrégats (« Relative surface ») en fonction de leur taille (« Equivalent dot diameter (µm) ») dans chaque condition. Cette analyse révèle que les points mesurés sont petits et distribués de manière homogène et stable dans le temps (Cf. Article Fig. 3). La taille minimale de ces points est d'environ 300 nm en accord avec la limite de résolution latérale du microscope confocal (Figure 43, C).

Cependant, la taille des signaux et leur localisation changent en fonction du temps d'incubation et de la concentration de BAY. Le noyau est donc graduellement vidé et les analyses de tailles des signaux révèlent que leur taille augmente à plus d'1µm (Figure 28, C, 5µM).

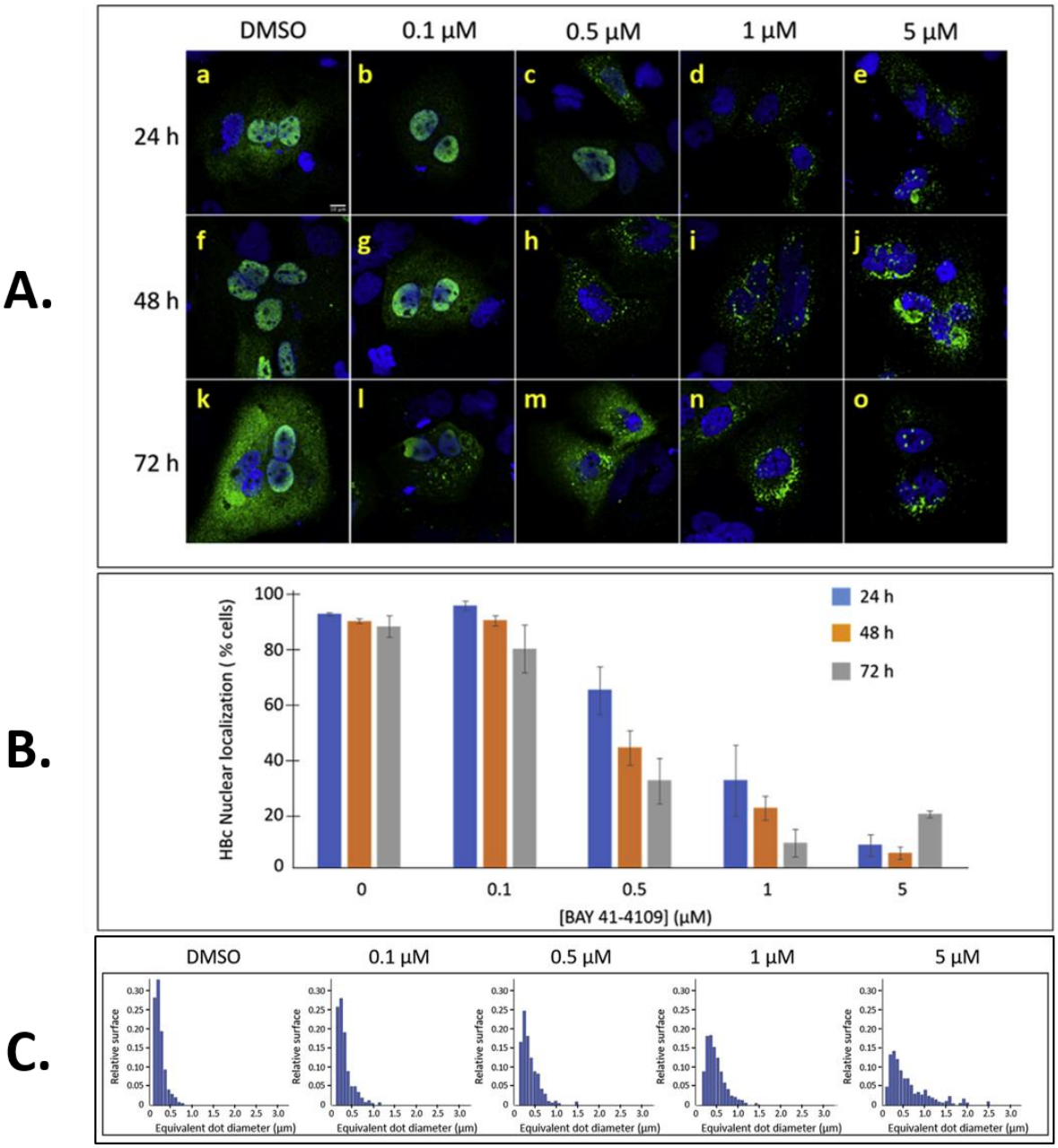


Figure 43 : Expérience d'immunofluorescence sur des cellules HuH-7 exprimant la protéine HBc traitées par le BAY 41-4109. A : Détection de l'HBc par immunofluorescence. L'HBc est marqué par un anti-HBc humain et un anticorps secondaire anti-humain couplé à l'Alexa 488. L'ADN nucléaire est contre-coloré avec du DAPI et les cellules sont observées par microscopie confocale. Chaque image correspond à une fusion des images des canaux bleu et vert et montre le phénotype majoritairement observé. Des agrégats nucléaires apparaissent à des concentrations et des temps d'incubation élevés. La barre d'échelle blanche correspond à 10µm. B : Histogramme représentant le pourcentage de cellules avec un marquage fluorescent cytoplasmique en fonction de la concentration en BAY 41-4109 et le temps d'incubation. HBc est observé dans le cytoplasme (phénotype : cytoplasme > noyau) ou dans le noyau (phénotype : noyau > cytoplasme) ou distribué de façon égale entre le cytoplasme et le noyau. La distribution de la fluorescence a été évaluée par observation à l'aveugle des sections confocales. Les pourcentages de cellules possédant un phénotype majoritairement cytoplasmique (cytoplasme > noyau) ont été déterminés par rapport au nombre total de cellules transfectées. Nous pouvons noter une diminution graduelle d'HBc dans le noyau en fonction de l'augmentation de la

concentration ou de la durée de traitement. C : Distribution de la taille des agrégats de la protéine HBc dans les cellules traitées par le BAY 41-4109. Chaque histogramme représente une concentration différente de BAY 41-4109, indiquée en haut. Chaque agrégat est détecté dans l'image et leurs aire est convertie en diamètre équivalent à un disque de la même aire. L'axe y correspond au pourcentage de la zone totale couverte par les agrégats pour chaque classe, tandis que l'axe x correspond au diamètre du disque. Nous pouvons noter un déplacement progressif en termes de distribution des tailles vers des agrégats plus larges avec l'augmentation de la concentration.

De larges agrégats (>3µm) sont parfois colocalisés avec le noyau quand les cellules sont traitées avec une concentration élevée de BAY 41-4109 (5µM) pendant 72h (Cf. Article Fig. 3, 72h, 5µM). Etant donné la grande taille de ces agrégats nous nous sommes demandés de quelle façon ces agrégats étaient localisés dans le noyau. Une analyse en z-stack a donc été faite sur des cellules traitées par 5µM de BAY 41-4109 pendant 72h. Nous observons la présence de petits agrégats localisés dans le noyau tandis que les plus gros agrégats sont davantage à travers ou insérés dans le noyau (Figure 44, respectivement A, B et C). Afin de révéler l'HBc en microscopie électronique, nous avons effectué une préparation des cellules qui permet l'immunomarquage des protéines, selon la technique Tokuyasu. Les protéines sont marquées par un anticorps primaire révélé par un anticorps secondaire couplé à des billes d'or de 6nm. Ces billes seront alors denses aux électrons et permettront ici de définir les structures positives pour HBc. Nous avons donc observé des cellules exprimant HBc et traitées par le BAY 41-4109 (ratio 0.9/0.1) en microscopie électronique après cette préparation (Figure 45, A). De nombreuses structures denses aux électrons sont positives pour l'HBc et correspondent aux agrégats précédemment décrits. Ces agrégats sont majoritairement retrouvés dans le cytoplasme des cellules (Figure 45, B). D'autres agrégats ont souvent été observés dans la région périnucléaire du cytoplasme et encerclés par des invaginations de l'enveloppe nucléaire (Figure 45, C et D). Toutefois, des agrégats denses aux électrons ont aussi été observés dans les noyaux (Figure 45, E).

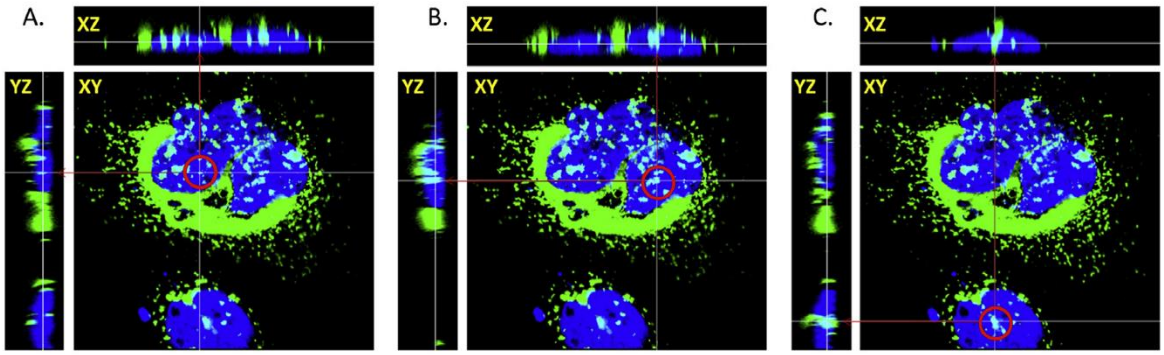


Figure 44 : Vues orthogonales en x-y, x-z et y-z montrant la colocalisation entre les agrégats d'HBc et le noyau. HBc a été détecté par marquage par immunofluorescence et le noyau est contre-coloré avec du DAPI. Des images 3D ont été obtenues par numérisation de séries de plans en x-y avec des pas de 300nm sur le plan axial. A, B et C correspondent au plan x-y de la même cellule et aux élargissements des vues orthogonales (x-z et y-z) présentés au-dessus et à gauche respectivement. De petits agrégats d'HBc sont trouvés dans le noyau, tandis que des agrégats plus larges sont trouvés à la périphérie du noyau, probablement enfermés dans des invaginations de l'enveloppe nucléaire.

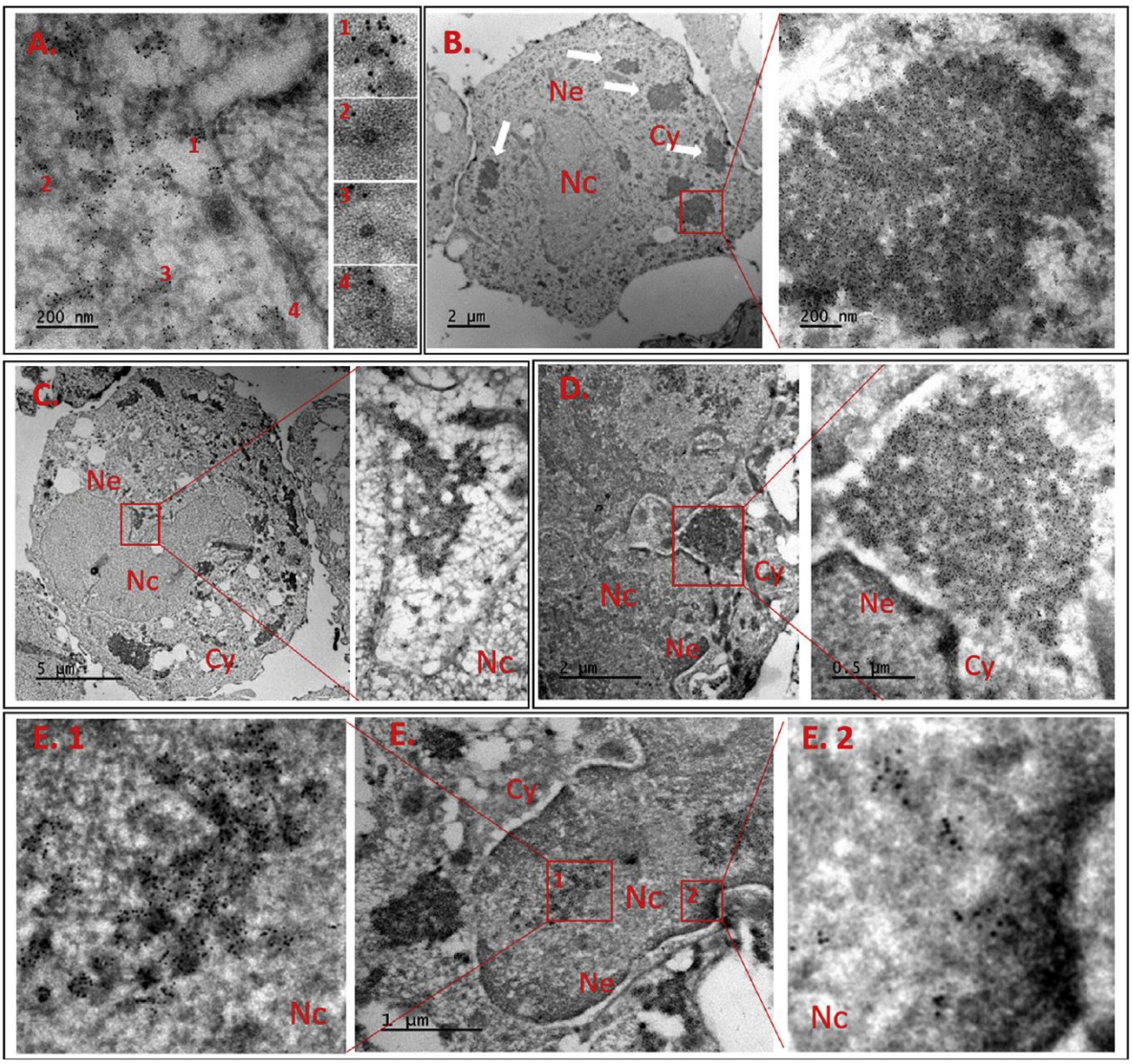


Figure 45 : Les agrégats induits par le BAY 41-4109 sont observés par microscopie électronique après immunomarquage. Des cellules HuH-7 sont transfectées transitoirement avec un mélange de plasmides exprimant HBc/HBc-eGFP et incubés avec 1µM BAY 41-4109 pendant 48h. Les cellules sont triées par l'eGFP et fixées avant inclusion en gélatine. Des sections ultrafines (70nm) sont coupées et incubées avec un anticorps anti-eGFP et lapin et un anticorps anti-lapin couplés à des billes d'or de 6nm. A : Cellules traitées par du DMSO. Les encarts 1-4 montrent diverses particules denses aux électrons correspondant à la capside d'HBc. B-E : Différents exemples de cellules traitées par le BAY 41-4109. Nc = Noyau, Ne = Enveloppe nucléaire, Cy = Cytoplasme.

Afin d'analyser l'ultrastructure de ces agrégats nous avons traité des cellules par 1µM de BAY 41-4109 et les avons préparés de façon classique en résine epon (Figure 46, A). Nous observons que ces agrégats sont constitués d'un matériel amorphe et désorganisé (Figure 46, B) conjointement avec des structures cristallines composées de capsides intactes arrangées les

unes à côté des autres (Figure 46, C, D). Ces agrégats sont souvent observés dans le cytoplasme enveloppés par une simple ou une double membrane (Figure 46, B).

Finalement ces résultats suggèrent que le BAY 41-4109 permet l'agrégation de capsides préformées et leur compression aboutissant en un matériel protéique amorphe.

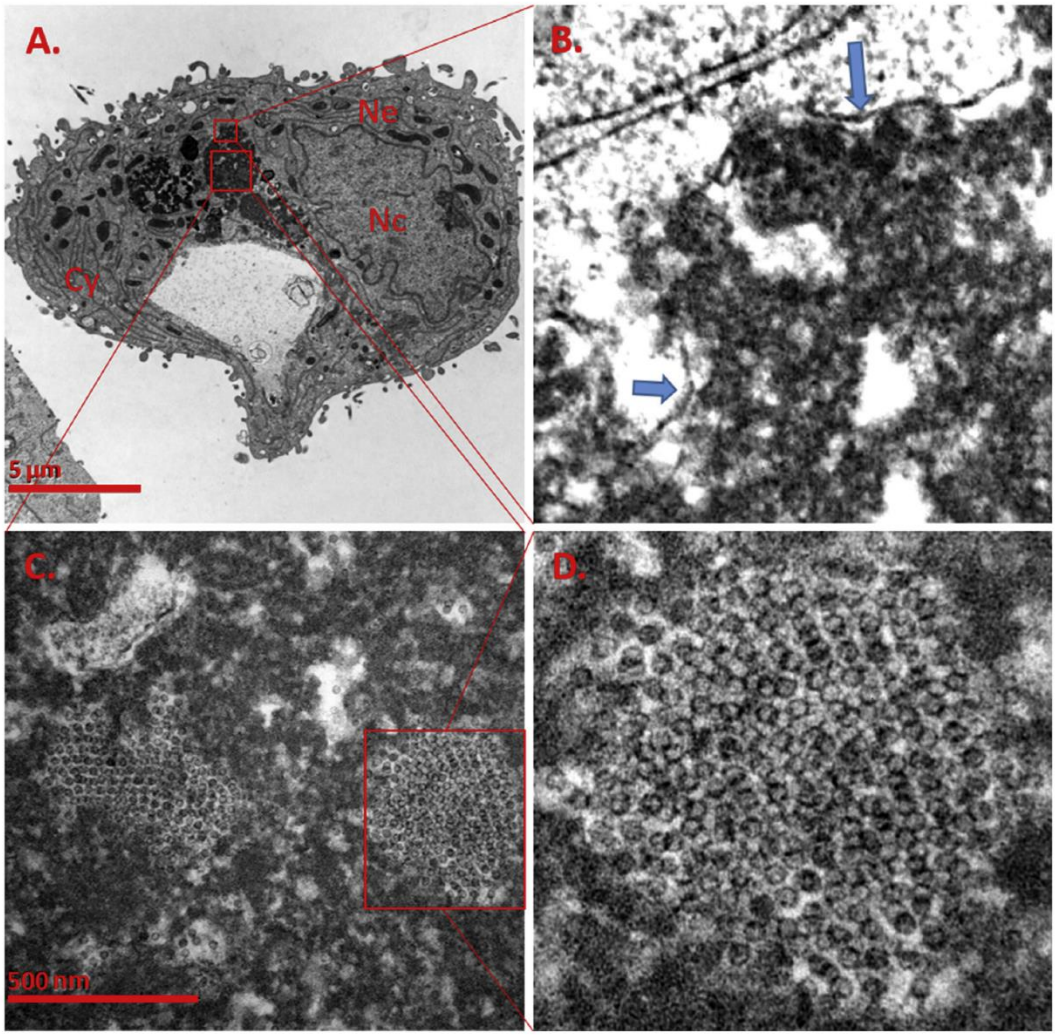


Figure 46 : Images de microscopie électronique des agrégats induits par le BAY 41-4109. Des cellules HuH-7 sont transfectées transitoirement avec un mélange de plasmides exprimant l'HBc/HBc-eGFP et traitées avec 1µM de BAY 41-4109 pendant 48h. Les cellules sont triées et fixées et des sections ultrafines sont coupées et contrastées avec de l'acétate d'uranyle/citrate. A : Cellules représentative affichant l'accumulation d'un matériel cytoplasmique dense aux électrons. B : Grossissement plus élevé de ce matériel dense aux électrons, correspondant probablement à un agrégat de protéines core. Les flèches bleues montrent une simple ou une double membrane pouvant correspondre à des autophagosomes. C : Grossissement plus élevé de matériaux denses aux électrons affichant des strates régulières de capsides d'HBc côte à côte. (Un grossissement plus élevé de cette zone est montré en D). Nous notons ici que les protéines agrégées et désorganisées d'HBc sont colocalisées avec des capsides intactes mais condensées d'HBc dans des structures dense aux électrons.

2. Manuscrit

Antiviral Research 169 (2019) 104557

Contents lists available at ScienceDirect

Antiviral Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/antiviral

BAY 41-4109-mediated aggregation of assembled and misassembled HBV capsids in cells revealed by electron microscopy

Virgile Rat[a], Florian Seigneuret[a], Julien Burlaud-Gaillard[b], Roxane Lemoine[c], Christophe Hourioux[a,b], Fabien Zoulim[d,e,f], Barbara Testoni[d,e,f], Jean-Christophe Meunier[a], Clovis Tauber[g], Philippe Roingeard[a,b], Hugues de Rocquigny[a,*]

[a] Morphogenèse et Antigénicité Du VIH et des Virus des Hépatites, Inserm – U1259 MAVIVH, Université de Tours et CHRU de Tours, 10 Boulevard Tonnellé - BP 3223, 37032, Tours Cedex 1, France
[b] Plate-Forme IBiSA des Microscopies, PPF ASB, Université de Tours and CHRU de Tours, 10 Boulevard Tonnellé - BP 3223, 37032, Tours Cedex 1, France
[c] B-Cell Resources Platform, EA4245 "Transplantation, Immunologie et Inflammation", Université de Tours, 10 Boulevard Tonnellé, 37032, Tours Cedex 1, France
[d] INSERM U1052-Cancer Research Center of Lyon (CRCL), 69008, Lyon, France
[e] University of Lyon, UMR_S1052, CRCL, 69008, Lyon, France
[f] Department of Hepatology, Croix Rousse Hospital, Hospices Civils de Lyon, France
[g] UMRS Inserm U1253 - Université de Tours, 10 Boulevard Tonnellé - BP 3223, 37032, Tours Cedex 1, France

ARTICLE INFO

Keywords:
HBV
Electron microscopy
Aggregation
CAMs
Confocal microscopy
HBc

ABSTRACT

HBc is a small protein essential for the formation of the icosahedral HBV capsid. Its multiple roles in the replication cycle make this protein a promising target for the development of antiviral molecules. Based on the structure of HBc, a series of HBV assembly inhibitors, also known as capsid assembly modulators, were identified. We investigated the effect of BAY 41–4109, a heteroaryldihydropyrimidine derivative that promotes the assembly of a non-capsid polymer. We showed, by confocal microscopy, that BAY 41–4109 mediated HBc aggregation, mostly in the cytoplasm of Huh7 cells. Image analysis revealed that aggregate size depended on BAY 41–4109 concentration and treatment duration. Large aggregates in the vicinity of the nucleus were enclosed by invaginations of the nuclear envelope. This deformation of the nuclear envelope was confirmed by transmission electron microscopy (TEM) and immuno-TEM. These two techniques also revealed that the HBc aggregates were accumulations of capsid-like shells with an electron-dense material consisting of HBV core fragments. These findings, shedding light on the ultrastructural organization of HBc aggregates, provide insight into the mechanisms of action of BAY 41–4109 against HBV and will serve as a basis for comparison with other HBV capsid assembly inhibitors.

1. Introduction

Despite the availability of an efficient vaccine, an estimated 300 million people are living with hepatitis B virus (HBV) infection, which causes- 900,000 deaths each year, mostly from complications, such as cirrhosis and hepatocellular carcinoma (Neuveut et al., 2010). Antiviral treatments are well tolerated but they cannot cure the infection (Liang et al., 2015).

HBV is an enveloped virus with a 3.2 kb partially double-stranded DNA genome protected by the HBc protein. HBc consists of 183–185 residues, forming two domains (Fig. 1): the N-terminal domain (NTD; residues 1–140), which assembles into a capsid, linked by a flexible linker to the basic C-terminal domain (residues 150–183), which interacts with nucleic acids (Venkatakrishnan and Zlotnick, 2016).

The role of HBc capsid formation and virus replication (Chu et al., 2014; Nassal et al., 1990) (for review see (Seeger and Mason, 2015)) justified its identification as a target in the search for molecules endowed with antiviral activity (Testoni et al., 2017). Based on X-ray crystallography of HBc-NTD derivatives and on cell based assay using mouse hepatocytes cell line a series of HBV assembly inhibitors, also referred to as capsid assembly modulators (CAMs) were identified (Klumpp et al., 2015; Konig et al., 1998; Koschel et al., 1999;

Abbreviations: HBV, hepatitis B virus; eGFP, enhanced green fluorescent protein; TEM, transmission electron microscopy; HBc, hepatitis B core protein; FACS, fluorescence-activated cell sorting; MOA, mechanisms of action; CAMs, capsid assembly modulators; ROI, regions of interest; HAP, heteroaryldihydropyrimidines

* Corresponding author. Morphogenèse et Antigénicité du VIH et des Virus des Hépatites, Inserm – U1259 MAVIVH, Hôpital Bretonneau, 10 boulevard Tonnellé - BP 3223, 37032, Tours Cedex 1, France.
E-mail address: hderocquigny@univ-tours.fr (H. de Rocquigny).

https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104557
Received 9 May 2019; Received in revised form 5 July 2019; Accepted 10 July 2019
Available online 11 July 2019
0166-3542/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

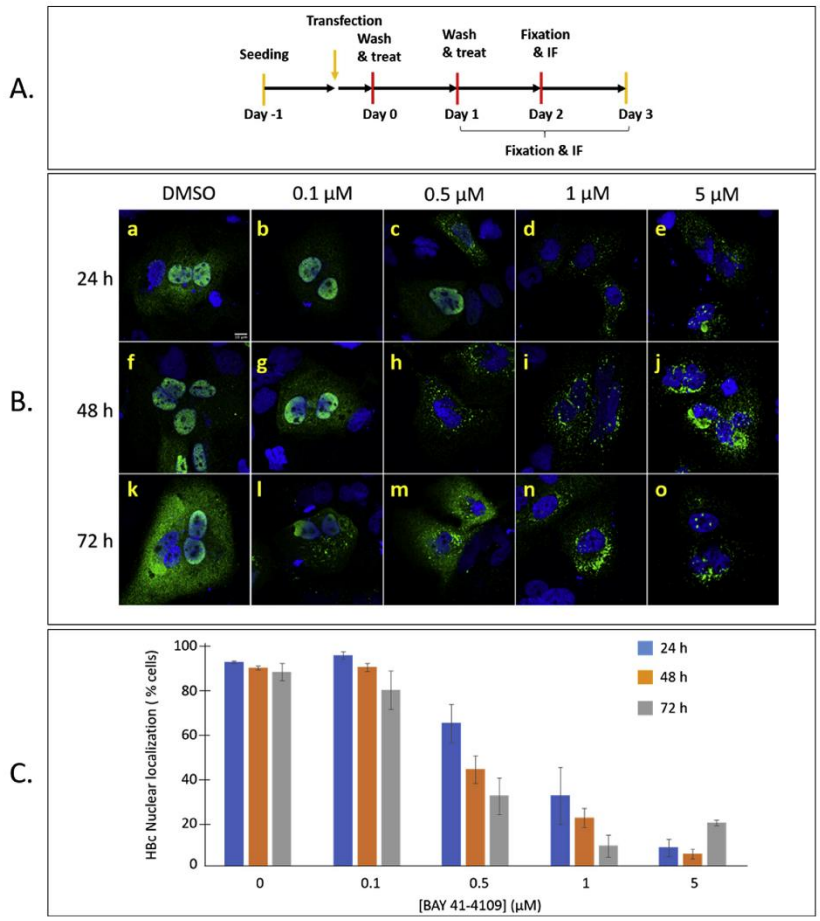


Fig. 2. Immunofluorescence assay on Huh7 cells expressing HBc treated with BAY 41–4109.
A: Diagram of the protocol. Huh7 cells were transfected, the day after plating, with a plasmid encoding HBc. They were then washed 6 h later and various concentrations of BAY 41–4109 were added (day 0). Cells were fixed and stained (day 1, time 24 h) or the medium was refreshed with the same concentration of molecule and the incubation was then stopped at 48 h (day 2) or 72 h (day 3). B: Detection of HBc by immunofluorescence. Cells were fixed, permeabilized and incubated with human anti-HBc antibody. They were thoroughly washed and incubated with anti-human goat antibody labeled with Alexa Fluor 488. Nuclear DNA was counterstained with DAPI and cells were imaged by confocal microscopy. Each image shown corresponds to the merging of the blue- and green-channel images and shows the major phenotype observed. Note that nuclear aggregates appear at higher concentrations or longer incubation times. The white scale bar represents 10 µm. C: Histogram showing the percentage of cells with cytoplasmic fluorescent staining as a function of BAY 41–4109 concentration and incubation time. HBc was observed in the cytoplasm (phenotype: cytoplasm > nucleus) or in the nucleus (phenotype: nucleus > cytoplasm) or was equally distributed between the cytoplasm and the nucleus. This fluorescence distribution was assessed by eye on confocal sections. The percentage of cells with the nucleus > cytoplasm phenotype was calculated by dividing the number of cells with this phenotype by the number of transfected cells and multiplying by 100. Note the progressive decrease in HBc levels in the nucleus with increasing concentration or duration time. Each set of conditions (time and concentration) was performed 3 times, and 80–100 cells were counted per set of conditions. Blue, orange and gray bars correspond to 24 h, 48 h and 72 h, respectively.

improve the signal-to-noise ratio and deconvolved with a regularized Lucy-Richardson approach to improve the separation of real clusters from the background. Images were then binarized with an automatic threshold, and morphological operators were applied to improve the separation of the various aggregates and to eliminate noise and background residuals. Finally, a watershed algorithm was used to detect and label the bright aggregates in the image. The area of each HBc aggregate was measured and converted into the diameter of a disk of equivalent area. Histograms of the percentage of the total area covered by aggregates of different sizes were constructed to represent the size distribution for each set of conditions.

2.7. Transmission electron microscopy

Cells expressing HBc/HBc-eGFP and treated with DMSO or 1 µM BAY 41–4109 for 48 h were sorted and fixed by incubation for 24 h in 4% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde (Sigma, St. Louis, MO) in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2). Samples were washed with PBS and

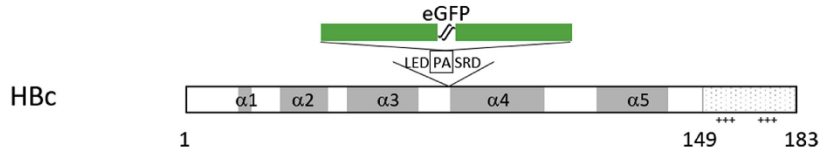


Fig. 1. Diagram of the HBc constructs.
The gray boxes correspond to the helical N-terminal domains of HBc, whereas the dotted box corresponds to the basic C-terminal domain. The fluorescent reporter eGFP is inserted at positions 78 and 80 (Kratz et al., 1999).

Venkatakrishnan and Zlotnick, 2016; Zhou et al., 2017; Campagna et al., 2013). Two classes of CAMs have been defined (Schinazi et al., 2018). The first class groups phenylpropenamide derivatives (PPAs), and sulfamoyl benzamides (SABs) (Berke et al., 2017; Campagna et al., 2013; Corcuera et al., 2018; Feld et al., 2007; Klumpp et al., 2015; Mani et al., 2018). The second class II includes heteroaryldihydropyrimidine (HAPs) (Boucle et al., 2017; Deres et al., 2003). Compounds of both classes reduce pgRNA encapsidation and prevent cccDNA formation (Berke et al., 2017; Boucle et al., 2017; Guo et al., 2017; Lahlali et al., 2018; Lam et al., 2017; Wu et al., 2013; Zhao et al., 2018). However, whereas morphologically intact but empty capsids are formed following treatment with class I molecules, class II molecules induce the production of aberrant capsid polymers *in vitro* (Bourne et al., 2006; Corcuera et al., 2018; Huber et al., 2018; Klumpp et al., 2015; Stray et al., 2005).

Assessments of the antiviral activity of HAP-related compounds in stably HBV-transfected HepAD38 cells or infected HepaRG cells showed that these molecules inhibited HBV replication with an EC_{50} ranging from 50 nM to 200 nM and low cytotoxicity with two-digit micromolar CC50 (Berke et al., 2017; Corcuera et al., 2018; Deres et al., 2003; Huber et al., 2018; Klumpp et al., 2015; Lahlali et al., 2018; Zhou et al., 2017). HAP treatment at 10 fold the EC_{50} for 4–10 days results in an accumulation of large HBc aggregates within the nucleus (Corcuera et al., 2018; Huber et al., 2018; Lahlali et al., 2018).

We describe here the effect on HBc cellular distribution after HAP BAY 41–4109 treatment at 10 times the EC_{50} (0.5–1 μM) for a shorter period (24 h–72 h). We observed aggregate formation, mostly in the cytoplasm, with any large aggregates close to the nucleus enclosed by invaginations of the nuclear envelope. Transmission electron microscopy (TEM) and immuno-TEM also revealed that HBc aggregates corresponded to accumulations of capsid-like shells compressed into an electron-dense material consisting of HBc core fragments, highlighting key differences between BAY 41-4109-mediated HBc aggregates and those obtained *in vitro* with HBc149. Our results shed light on the antiviral mechanisms driven by these molecules and should facilitate comparative studies with other inhibitors of HBV capsid assembly.

2. Materials and methods

2.1. Plasmid DNA

The pTR-UF-HBc183-eGFPopt plasmid encoding a full-length HBc was obtained from Prof. M. Nassal (Kratz et al., 1999). This plasmid encodes a protein in which eGFP, flanked by flexible linkers, replaces amino acids P79 and A80 (Fig. 1) (Kratz et al., 1999; Vogel et al., 2005; Yoo et al., 2012). We obtained pcDNA3-HBc by removing the eGFP sequence from pcDNA-HBc-eGFP with the forward primer GTT-AAC-CTC-GAG-GAT-CCA-GCA-TCT-AGA-GAC-CTG-GTA and the reverse primer TAC-CAG-GTC-TCT-AGA-TGC-TGG-ATC-CTC-GAG-GTT-AAC to re-introduce the ^{79}PA^{80} sequence.

2.2. Cell culture

Experiments were carried out on the Huh7 cell lines. Cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, France) and 1% antibiotic mixture (penicillin/streptomycin: Gibco, France) at 37 °C, under an atmosphere containing 5% CO_2. Cells were transfected with jetPEI™ (Life Technologies, Saint Aubin, France).

2.3. Confocal microscopy

We used 2×10^5 Huh7 or HepG2 cells to seed 24-well plates. The cells were transfected with a plasmid encoding HBc. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, permeabilized with 0.2% Triton/PBS and blocked with 0.4% BSA. The cells were then incubated with a human anti-HBc antibody (Roingeard et al., 1990b), and after washings incubated with Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-human antibody (Thermo Fisher Scientific). The last wash contained DAPI and the cells were stored in PBS at 4 °C until observation. Confocal fluorescence micrographs were obtained with a LEICA SP8 gSTED confocal microscope equipped with 63x PL APO 1.40 CS2 Oil (or 40x PL APO 1,30 CS2 Oil), a laser diode at 405 nm for DAPI and an argon laser at 488 nm for Alexa 488. Z-stack images were obtained with LAS X optimized settings. Briefly, images were acquired with 1024 × 1024 pixels in the *x*–*y* plane, with a pixel size of 150 nm and a step size of 300 nm along the axial axis; we obtained 120–150 images in total, depending on cell thickness (40–50 μm).

2.4. Cell toxicity assay

The cells were treated for 48 h with BAY 41–4109, and a viability test was then performed with 0.5 mg/mL MTT, with detection in a mixture of 0.1% NP40 and 0.067% 6 N HCl in isopropanol. The plate was analyzed with a 630 nm reference filter and a 570 nm test filter. A simultaneous LDH cytotoxicity assay (Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit, Thermo Fisher Scientific) was performed with an associated procedure. Both assays were read with a Dynex MRX TC Revelation Microplate Reader.

2.5. BAY 41–4109 treatment

BAY 41–4109 was synthesized as previously described (Billioud et al., 2011). Six hours after transfection, cells were washed and incubated in 400 μl DMEM, to which we added 4 μl DMSO (1% v/v) or 4 μl of stock solution containing 100 μM BAY 41–4109 in DMSO. The cells were incubated for 24 h, then washed, fixed with PFA and incubated with a specific anti-HBc antibody (Roingeard et al., 1990b). For longer time periods, the medium was refreshed in the same conditions and incubated for an additional 24 h. This protocol is summarized in Figs. 2A and 4A. Dilutions were adapted to obtain 0.1, 0.5 and 5 μM BAY 41–4109, whilst keeping the quantity of DMSO constant (1% v/v).

2.6. Image analysis

We quantitatively analyzed 225 images (3 durations x 5 doses x 15 samples each). All the methods used were implemented in Matlab® 2017b. The images were first pre-processed by wavelet denoising to

post-fixed by incubation with 2% osmium tetroxide (Agar Scientific, Stansted, UK) for 1 h. Cells were then fully dehydrated in a graded series of ethanol solutions (70%, 90% and 100%) and propylene oxide (100%). The samples were impregnated with a 1:1 mixture of propylene oxide/Epon resin (Sigma) and then incubated overnight in pure resin. They were then embedded in Epon resin (Sigma) and left to polymerize for 48 h at 60 °C. Ultrathin sections (90 nm) were cut with an EM UC7 ultramicrotome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Contrast staining was performed with 2% uranyl acetate (Agar Scientific) and 5% lead citrate (Sigma), and the samples were then observed in a transmission electron microscope (JEOL 1011, Tokyo, Japan).

2.8. Immunogold labeling of ultrathin cryosections by the Tokuyasu method (Tokuyasu, 1973)

Cells expressing HBc/HBc-eGFP and treated with DMSO or with 1 μM BAY 41–4109 for 48 h were sorted and fixed by incubation for 2 h with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (pH 7.6). They were then washed twice with PBS (pH 7.6) and embedded in gelatin (12%). They were infused overnight at 4 °C with 2.3 M sucrose and ultrathin cryosections were then cut at −110 °C on a Leica Microsystems FC7 cryo-ultramicrotome. Sections (80 nm thick) were retrieved in a 1:1 mixture of 2% methylcellulose/2.3 M sucrose and collected on formvar/carbon-coated nickel grids. The gelatin was removed by heating at 37 °C, and the sections were incubated with 1:200 rabbit anti-GFP antibody (ABCAM, ref AB6556) in PBS. The grids were washed six times, for 5 min each, with PBS, and were then incubated with 1:30 gold-conjugated (6 nm particles) goat anti-rabbit (6 nm) antibody in PBS (Aurion, Wageningen, the Netherlands). The grids were washed in PBS (six washes, each lasting 5 min), and rinsed in distilled water. The grids were contrast stained by incubation in a 1:10 mixture of 2% uranyl acetate/2% methylcellulose and viewed in a transmission electron microscope operating at 100 kV (JEOL 1011).

3. Results

3.1. The size and location of BAY 41-4109-induced HBc aggregates depend on time and concentration

The effect of CAMs on HBc aggregation and the cellular localization of these aggregates were unclear and seemed to depend on the class of compound used, its concentration and the duration of treatment (Corcuera et al., 2018; Huber et al., 2018; Nair et al., 2018). We investigated the effect of BAY 41–4109 on HBV capsid morphogenesis in more detail, using Huh7 cells expressing HBc and determining the location and size of the aggregates for various product concentrations and treatment times.

We therefore transfected Huh7 cells with a plasmid encoding HBc alone and incubated them with either DMSO or 0.1–5 μM of BAY 41–4109. Treatment duration was one to three days (Fig. 2A), and the cells were then fixed and stained for HBc with a human polyclonal anti-HBc antibody (Fig. 2B). Consistent with published data (Corcuera et al., 2018; Deroubaix et al., 2015; Sharma et al., 2002; Zhang et al., 2016), we estimated that, 24 h post-transfection and in the absence of BAY 41–4109, ~90% of cells presented punctate HBc staining predominantly localized in the nucleus (Fig. 2B, image a and Fig. 2C, blue bar). This phenotype remained unchanged over periods of 48 h (Fig. 2B, image f and Fig. 2C, orange bar) and 72 h (Fig. 2B, image k and Fig. 2C, gray bar) after transfection. A quantitative analysis of these images revealed that the area covered by the puncta was evenly distributed, small (equivalent to a dot diameter of no more than 0.3 μm, given the lateral diffraction limit (Klar et al., 2000)), and stable over time (Fig. 3, first column). Conversely, both the location and the area of the HBc puncta gradually changed during the incubation of the cells with BAY 41–4109 (0.1 μM, 0.5 μM and 1 μM) for 24–72 h (Fig. 2B, second and third columns). Indeed, the nucleus gradually emptied (Fig. 2C) and image analysis to assess aggregate size revealed a significant number of aggregates with an equivalent diameter of more than 1 μm (Fig. 3, second, third and fourth columns). This result clearly demonstrates the concentration and time dependence of the BAY 41-4109-mediated aggregation of HBc. Consistent with this result, the same phenotype was observed when cells were treated for 24 h with a higher concentration of BAY 41–4109 (5 μM): a large decrease in the nuclear signal (Fig. 2B, first row, Fig. 2C, blue bars) accompanied by the formation of significantly larger puncta in the cytoplasm, with an equivalent diameter of more than 2 μm (Fig. 3, first row). We also investigated various cell types including HepG2 cells expressing HBc alone, Huh7 cells expressing the entire genome, or the HepAD38 cell line that constitutively produce HBV virions. These experiments demonstrated that the BAY 41-0941-mediated purge of the nucleus and formation of cytoplasmic HBc aggregates was independent from the cell type and the replication cycle (Fig. S1).

Taken together, our results show that the size of HBc aggregates (Fig. 3) is clearly correlated with their distribution in the cytoplasm (Fig. 2C).

3.2. Are the nuclear aggregates in the nucleus or at the periphery of the nucleus?

Large aggregates (diameter > 3 μm) were sometimes colocalized with the nucleus when cells expressing HBc were treated with high concentrations of BAY 41–4109 (5 μM) for a longer time period (72 h) (Fig. 2B, last row and Fig. 2C). Given the size of these aggregates, we wondered how such large HBc clusters could localize within the nucleus, given that when Huh7 (or HepAD38) cells are cultured in two-dimensional monolayers, the plated cells contain an oval nucleus with a mean diameter of 10–15 μm (Fig. 2) and a mean height of 3–5 μm (Corcuera et al., 2018; Webster et al., 2009). A *z*-scan acquisition analysis was performed on cells treated with 5 μM BAY 41–4109 for 72 h (Fig. 4). Three regions of interest (ROI) were highlighted on the *x-y* plane of the same cell (red circle) and the *x-z* and *y-z* views of each ROI were enlarged and are reported above (*x-z*) and on the left (*y-z*) of the image. ROI 1 shows a small HBc aggregate within the nucleus (Fig. 4A) whereas ROI 2 and 3 display larger aggregates inserted into (Fig. 4B) or crossing (Fig. 4C) the entire nucleus. Overall, these images provide evidence that, although small HBc clusters can be found within the nucleus, most, if not all, of the large aggregates are not actually within the nucleus, but are actually in the cytoplasm and at the periphery of nucleus.

3.3. Ultrastructural organization of HBc aggregates in cells, as shown by electron microscopy and immunoelectron microscopy

The effect of CAMs on HBc assembly was investigated *in vitro* by TEM on purified HBc149 from which the basic C-terminal domain was deleted (Huber et al., 2018; Stray et al., 2005; Wu et al., 2013). We investigated the effect of BAY 41–4109 on the HBV capsid shell further by performing TEM and immunoTEM on cells expressing native HBc. These two complementary methods were used to visualize ultrastructural modifications accurately (TEM) and to localize HBc within untreated or BAY 41-4109-treated cells (Immuno-TEM). Cells were therefore transfected with a plasmid expressing HBc together with a plasmid expressing HBc-eGFP (ratio 9:1) and treated for 48 h with 1 μM BAY 41–4109. Cells were sorted by FACS and the pellets obtained were processed for TEM or immuno-TEM.

Immuno-TEM on naïve cells demonstrated the presence of the native capsid (Fig. 5A, enlargements 1–4). Conversely, electron-dense material was easily detected in the cytoplasm of BAY 41-4109-treated cells (Fig. 5B, white arrows) and immuno-TEM confirmed that these structures were strongly positive for HBc protein (Fig. 5B, inset showing intense immunogold labeling for the HBc protein). These large HBc-positive aggregates were never observed in absence of BAY 41–4109

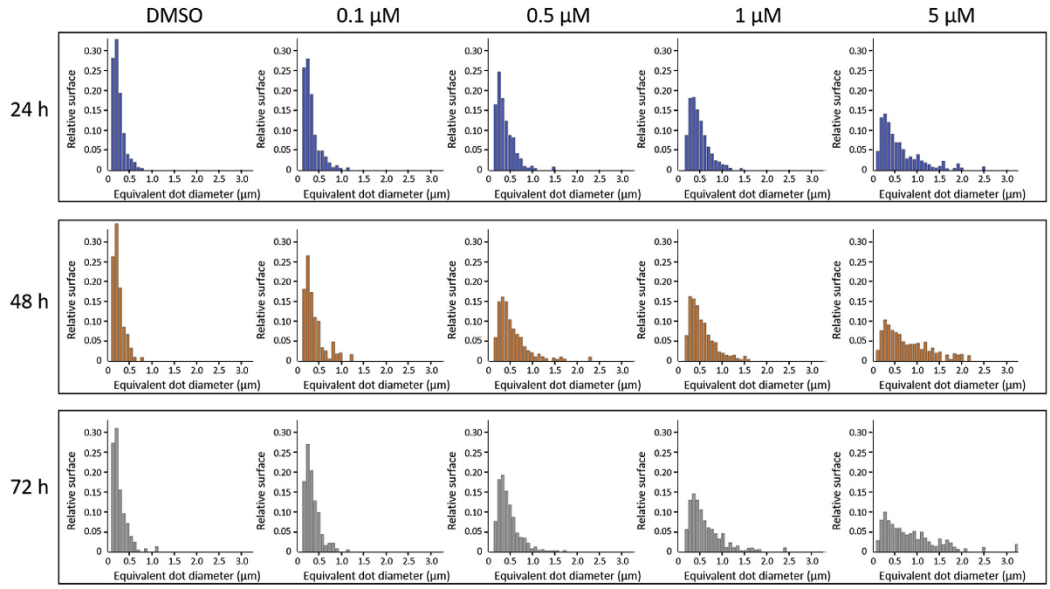


Fig. 3. Distribution of the sizes of HBc aggregates in BAY 41–4109-treated cells.
Each histogram represents a different set of conditions: blue, orange and gray histograms correspond to 24 h, 48 h and 72 h, respectively, and each column represents a different concentration of BAY 41–4109, as indicated at the top of the figure. The total area of each histogram is the same. Each aggregate is detected in the image and its area is converted into the equivalent diameter of a disk of the same area. The smallest areas were ~0.3 µm in diameter, consistent with the diffraction limit (Klar et al., 2000). The *y* axis corresponds to the percentage of the total area covered by aggregates for the given class, whereas the *x* axis corresponds to the disk diameter. Note the progressive shift in size distribution towards larger aggregates with increasing concentration and treatment duration. This analysis was performed on 10–15 images par set of conditions.

treatment, after a careful examination of at least 100 sections of control (DMSO treatment) cells. The large HBc aggregates appeared to be localized within the nucleus on confocal microscopy (Fig. 4), but a precise analysis of their localization by electron microscopy showed them to be mostly cytoplasmic. Electron-dense HBc-positive aggregates were often detected in the perinuclear area, partially surrounded by the nuclear compartment (Fig. 5C and D). These aggregates were actually located in cytoplasmic areas enclosed by invaginations of the nuclear envelope. Nevertheless, in some cases, it was possible to visualize the presence of HBc-positive aggregates within the nuclear compartment (Fig. 5 E1 and 5 E2). To analyze the precise ultrastructure of these aggregates, we then studied the cells by standard TEM (Fig. 6 A). We found that they consisted of amorphous unorganized material (Fig. 6B) mixed with arrays of intact capsid shells arranged edge-to-edge (Fig. 6C and D). Such capsid arrays were never observed in previous EM studies of HBV producing cells (Gerber et al., 1988; Roingeard et al., 1990a; Roingeard and Sureau, 1998) and were not observed in our control (DMSO treatment) cells. On several occasions, a single or double membrane was observed around the electron-dense structures localized in the cytoplasm (Fig. 6, panel B, blue arrows) that could correspond to autophagosome (Lai and Devenish, 2012).

Taken together, these observations suggest that BAY 41–4109 may aggregate preformed capsids tightly together, compressing them into an amorphous protein material.

4. Discussion

The discovery of the three-dimensional structure of HBc paved the way for the development of molecules directed against HBV core protein with a high antiviral potential. We investigated the impact of HAP

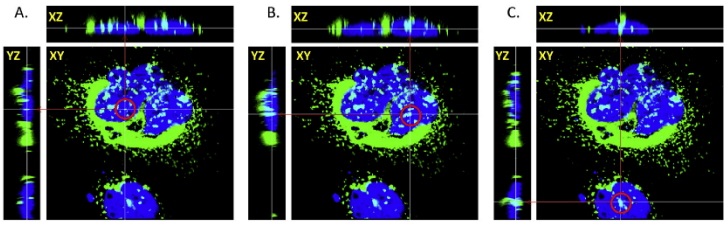


Fig. 4. Examples of *x-z* and *y-z* orthogonal views showing the colocalization of HBc aggregates and the nucleus.
HBc was detected by immunofluorescence staining and the nucleus was counterstained with DAPI. 3D images were obtained by scanning a series of *x-y* planes with axial steps of 300 nm. A, B and C correspond to the *x-y* plane of the same cell and the enlargements of these orthogonal views (*x-z* and *y-z*) are presented above and on the left, respectively. Small HBc aggregates were found within the nucleus, whereas larger HBc aggregates were found at the periphery of the nucleus, probably enclosed in invaginations of the nuclear envelope.

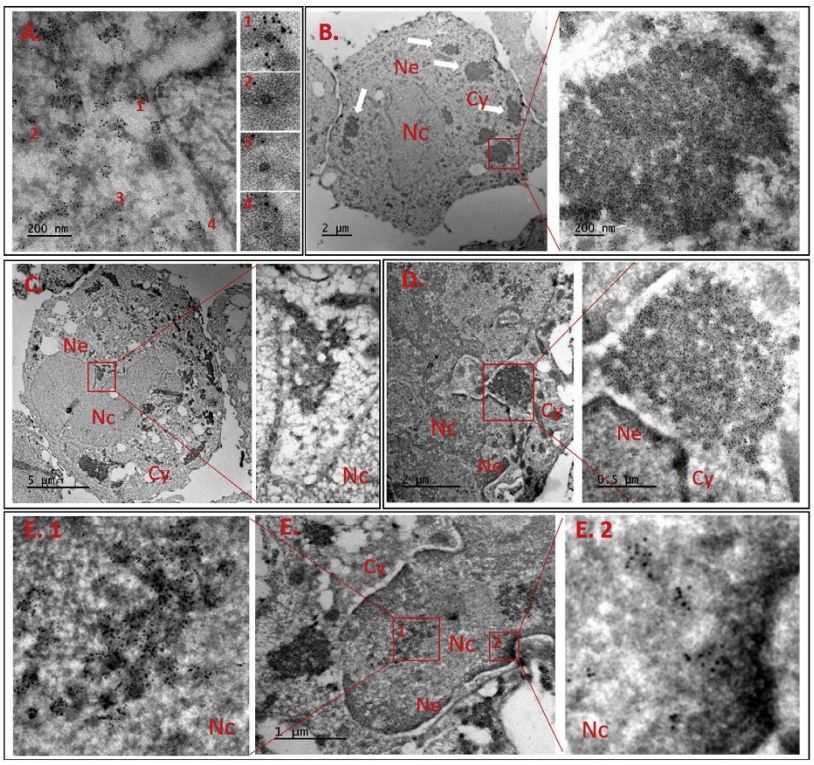


Fig. 5. BAY 41–4109-induced HBc aggregates observed by Immuno-TEM, with the Tokuyasu method.
Huh7 cells were transiently transfected with a mixture of DNA plasmids expressing HBc/HBc-eGFP and incubated with 1 µM BAY 41–4109 for 48 h. After GFP-based sorting, the fixed cells were embedded in gelatin and ultrathin sections were cut and incubated first with rabbit anti-GFP antibody and then with anti-rabbit antibodies conjugated with 6 nm gold particles. A: Huh7 cell expressing HBc/HBc-eGFP and treated with DMSO. Insets 1–4 show various electron-dense particles corresponding to the HBc capsid. B–E: Different examples of Huh7 cells expressing HBc/HBc-eGFP and treated with BAY 41–4109. Nc: Nucleus; Ne: Nuclear envelope; Cy; Cytoplasm.

on HBc in cells, by treating cells expressing HBc with BAY 41–4109 and assessing the intracellular localization and aggregation behavior of HBc. We confirm here that this HAP chemotype induces the formation of large HBc clusters in a time- and dose-dependent manner (Corcuera et al., 2018; Huber et al., 2018; Lahlali et al., 2018; Nair et al., 2018). However, the distribution of these clusters is variable, with accumulation in both the nucleus (Corcuera et al., 2018; Huber et al., 2018; Lahlali et al., 2018) and the cytoplasm ((Nair et al., 2018) and this study, Fig. 2). This heterogeneity of HBc aggregate distribution may be due to the experimental conditions in our study, as we used a low concentration of BAY 41–4109 and a short treatment time. Previous studies also used compounds with the same HAP backbone but surrounded by different chemical groups. Consistent with this hypothesis, structural studies showed that different HAP congeners interact differently with HBc (Klumpp et al., 2015; Zhou et al., 2017), resulting in different effects on capsid structure (Bourne et al., 2006; Katen et al., 2013; Venkatakrishnan et al., 2016). It remains unclear why HBc is found in the nucleus in non-treated cells but aggregates mostly in the cytoplasm in BAY 41-4109-treated cells (Fig. 2). However, the BAY 41–4109-mediated HBc aggregation follows very rapid kinetics (Bourne et al., 2008), such that the cytoplasmic HBc population may aggregate immediately, following the entry of BAY 41–4109 into the cell. In addition, HBc is translated in the cytoplasm (Blondot et al., 2016), where the protein is captured by the aggregation process, which displaces the equilibrium from the nucleus to the cytoplasm. Consequently, BAY 41–4109 may be trapped in cytoplasmic HBc clusters and longer times or higher concentrations may be required to reach the nuclear compartment. Zlotnick and coworkers recently described a fluorescent HAP derivative that was not observed in the nucleus (Nair et al., 2018). For long treatment times and high CAM concentrations, the results of all studies converge (Corcuera et al., 2018; Huber et al., 2018), with the observation of large aggregates mostly, but not exclusively, in the nucleus. However, our study casts doubts on the localization of HBc aggregates within the nucleus. Consistent with the size of the aggregates (2–3 µm; Fig. 3), we found that large HBc clusters were located at the periphery of the nucleus, partly enclosed by invaginations of the nuclear envelope (Figs. 4–6).

We then investigated the structure of HBc clusters. In studies with a purified HBc NTD, HAP derivatives have been shown to divert the assembly of HBc149 lacking the basic C-terminus, resulting in the formation of irregular capsids with open edges associated with large sheet- and tube-like structures (Bourne et al., 2008; Klumpp et al., 2015; Stray et al., 2005; Venkatakrishnan et al., 2016; Zhou et al., 2017). We provide here, for the first time in a cellular context and using the full-length HBc, a very different view of the ultrastructure of the HBc clusters. We observed two main cluster morphologies. The capsids

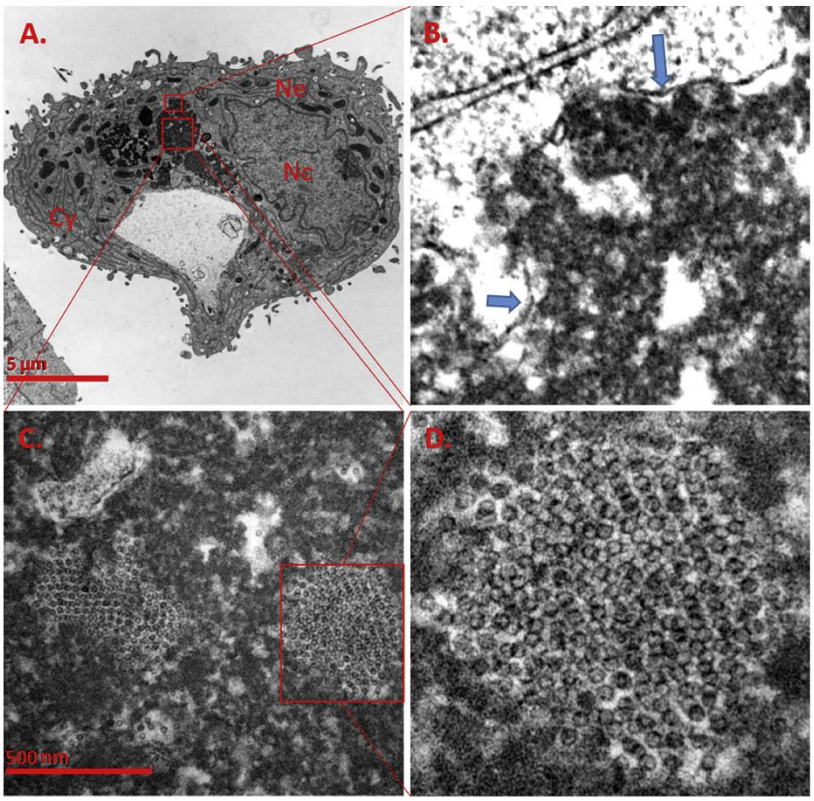


Fig. 6. Electron micrographs of BAY 41–4109-induced HBc aggregates.
Huh7 cells were transiently transfected with a mixture of DNA plasmids expressing HBc/HBc-eGFP and treated with 1 µM BAY 41–4109 for 48 h. The cells were sorted and fixed and ultrathin sections were cut and contrast-stained with uranyl acetate/citrate. A: Typical cell displaying an accumulation of electron-dense cytoplasmic material not observed in control cells. B: Higher magnification of this electron-dense material, probably corresponding to an aggregation of HBc protein. Blue arrows show simple or double membrane potently corresponding to autophagosomes. C: High magnification of the electron-dense material showing regular edge-to-edge layers of HBc capsids (a higher magnification of this area is also shown in D). Note that unorganized aggregated HBc protein is colocalized with intact but condensed HBc capsids in this electron-dense material.

seemed to retain their native form, but rather than being dispersed throughout the cell as single particles, they were aggregated together, sometimes edge-to-edge or in an overlapping manner (Fig. 6 and Fig. S2). These aggregations of intact capsids that were not observed *in vitro* with HBc149 may reflect a different mechanism of BAY 41–4109-mediated HBc misassembly. Indeed, the basic C-terminus may, together with potent cellular partners, participate in HBc assembly kinetics, competing with HAP potency (Ludgate et al., 2016). In the other cluster morphology, an electron-dense structure (Figs. 5 and 6), identified as an amorphous aggregate of core proteins (Fig. 6) was observed. This structure probably corresponds to the aggregation of low-order HBc oligomers trapped in an assembly-deficient state, consistent with the ability of BAY 41–4109 to promote protein-protein interactions (Venkatakrishnan and Zlotnick, 2016). Alternatively, it may correspond to hydrolyzed HBc fragments, consistent with the findings of western-blot analysis (Deres et al., 2003; Huber et al., 2018)). Interestingly, these two aggregate morphologies were mostly associated, in the same electron-dense areas of the cells, suggesting that BAY 41–4109 treatment may cause a compression (and disruption) of the capsid shell to generate this amorphous aggregated protein material. Alternatively, we cannot exclude the possibility that BAY 41–4109 aggregates the unassembled core proteins together with preformed capsid shells, leading to an association of these two different structures in the same areas of the cell.

5. Conclusion

We found that BAY 41–4109 induced HBc aggregation mostly in the cytoplasm and that aggregates formed at the periphery of the nucleus were partially surrounded by invaginations of the nuclear envelope. These HBc aggregates consisted of capsid-like structures aggregated together and mixed with fragments of HBc proteins. Although this molecule is not used clinically, understanding its mechanisms of action will serve as a basis for comparison with other assembly inhibitors currently in development and for some in clinical trials.

Conflicts of interest

None declared.

Acknowledgments

We thank Emmanuelle Blanchard-Laumonnier for fruitful discussions and Jean-Luc Darlix and Julie Sappa for careful reading of the manuscript. We thank M Nassal for plasmids encoding HBc-eGFP. This work was supported by the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites virales. We also thank Pierre-Ivan Raynal and Juliette Rousseau from the Electron Microscopy (EM) Facility (IBiSA) of Tours University (http://microscopies.med.univ-tours.fr) for technical support. We thank Cyrille Hoarau from the B Cell Resources (BCR) Facility of Tours University for technical support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104557.

References

Berke, J.M., Dehertogh, P., Vergauwen, K., Van Damme, E., Mostmans, W., Vandyck, K., Pauwels, F., 2017. Capsid assembly modulators have a dual mechanism of action in primary human hepatocytes infected with hepatitis B virus. Antimicrob. Agents Chemother. 61. https://doi.org/10.1128/aac.00560-17.

Billioud, G., Pichoud, C., Puerstinger, G., Neyts, J., Zoulim, F., 2011. The main hepatitis B virus (HBV) mutants resistant to nucleoside analogs are susceptible in vitro to non-nucleoside inhibitors of HBV replication. Antivir. Res. 92, 271–276. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.08.012.

Blondot, M.L., Bruss, V., Kann, M., 2016. Intracellular transport and egress of hepatitis B virus. J. Hepatol. 64, S49–s59. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.008.

Boucle, S., Lu, X., Bassit, L., Ozturk, T., Russell, O.O., Amblard, F., Coats, S.J., Schinazi, R.F., 2017. Synthesis and antiviral evaluation of novel heteroarylpyrimidines analogs as HBV capsid effectors. Bioorg. Med. Chem. Lett 27, 904–910. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.01.010.

Bourne, C., Lee, S., Venkataiah, B., Lee, A., Korba, B., Finn, M.G., Zlotnick, A., 2008. Small-molecule effectors of hepatitis B virus capsid assembly give insight into virus life cycle. J. Virol. 82, 10262–10270. https://doi.org/10.1128/jvi.01360-08.

Bourne, C.R., Finn, M.G., Zlotnick, A., 2006. Global structural changes in hepatitis B virus capsids induced by the assembly effector HAP1. J. Virol. 80, 11055–11061. https://doi.org/10.1128/jvi.00933-06.

Campagna, M.R., Liu, F., Mao, R., Mills, C., Cai, D., Guo, F., Zhao, X., Ye, H., Cuconati, A., Guo, H., Chang, J., Xu, X., Block, T.M., Guo, J.T., 2013. Sulfamoylbenzamide derivatives inhibit the assembly of hepatitis B virus nucleocapsids. J. Virol. 87, 6931–6942. https://doi.org/10.1128/jvi.00582-13.

Chu, T.H., Liou, A.T., Su, P.Y., Wu, H.N., Shih, C., 2014. Nucleic acid chaperone activity associated with the arginine-rich domain of human hepatitis B virus core protein. J. Virol. 88, 2530–2543. https://doi.org/10.1128/JVI.03235-13.

Corcuera, A., Stolle, K., Hillmer, S., Seitz, S., Lee, J.-Y., Bartenschlager, R., Birkmann, A., Urban, A., 2018. Novel non-heteroarylpyrimidine (HAP) capsid assembly modifiers have a different mode of action from HAPs in vitro. Antivir. Res. 158, 135–142. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.07.011.

Deres, K., Schroder, C.H., Paessens, A., Goldmann, S., Hacker, H.J., Weber, O., Kramer, T., Niewohner, U., Pleiss, U., Stoltefuss, J., Graef, E., Koletzki, D., Masantschek, R.N., Reimann, A., Jaeger, R., Gross, R., Beckermann, B., Schlemmer, K.H., Haebich, D., Rubsamen-Waigmann, H., 2003. Inhibition of hepatitis B virus replication by drug-induced depletion of nucleocapsids. Science (New York, N.Y.) 299, 893–896. https://doi.org/10.1126/science.1077215.

Deroubaix, A., Osseman, Q., Cassany, A., Begu, D., Ragues, J., Kassab, S., Laine, S., Kann, M., 2015. Expression of viral polymerase and phosphorylation of core protein determine core and capsid localization of the human hepatitis B virus. J. Gen. Virol. 96, 183–195. https://doi.org/10.1099/vir.0.064816-0.

Feld, J.J., Colledge, D., Sozzi, V., Edwards, R., Littlejohn, M., Locarnini, S.A., 2007. The phenylpropenamide derivative AT-130 blocks HBV replication at the level of viral RNA packaging. Antivir. Res. 76, 168–177. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.06.014.

Gerber, M.A., Sells, M.A., Chen, M.I., Thung, S.N., Tabibzadeh, S.S., Hood, A., Acs, G., 1988. Morphologic, immunohistochemical, and ultrastructural studies of the production of hepatitis B virus in vitro. Labor. Investig. J. Tech. Methods Pathol. 59, 173–180 (https://doi.org/).

Guo, F., Zhao, Q., Sheraz, M., Cheng, J., Qi, Y., Su, Q., Cuconati, A., Wei, L., Du, Y., Li, W., Chang, J., Guo, J.T., 2017. HBV core protein allosteric modulators differentially alter cccDNA biosynthesis from de novo infection and intracellular amplification pathways. PLoS Pathog. 13, e1006658. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006658.

Huber, A.D., Wolf, J.J., Liu, D., Gres, A.T., Tang, J., Boschert, K.N., Puray-Chavez, M.N., Pineda, D.L., Laughlin, T.G., Coonrod, E.M., Yang, Q., Ji, J., Kirby, K.A., Wang, Z., Sarafianos, S.G., 2018. The heteroaryldihydropyrimidine bay 38-7690 induces hepatitis B virus core protein aggregates associated with promyelocytic leukemia nuclear bodies in infected cells. mSphere 3. https://doi.org/10.1128/mSphereDirect.00131-18.

Katen, S.P., Tan, Z., Chirapu, S.R., Finn, M.G., Zlotnick, A., 2013. Assembly-directed antivirals differentially bind quasiequivalent pockets to modify hepatitis B virus capsid tertiary and quaternary structure. Structure (London, England : 1993) 21, 1406–1416. https://doi.org/10.1016/j.str.2013.06.013.

Klar, T.A., Jakobs, S., Dyba, M., Egner, A., Hell, S.W., 2000. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 8206–8210 (https://doi.org/).

Klumpp, K., Lam, A.M., Lukacs, C., Vogel, R., Ren, S., Espiritu, C., Baydo, R., Atkins, K., Abendroth, J., Liao, G., Efimov, A., Hartman, G., Flores, O.A., 2015. High-resolution crystal structure of a hepatitis B virus replication inhibitor bound to the viral core protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 112, 15196–15201. https://doi.org/10.1073/pnas.1513803112.

Konig, S., Beterams, G., Nassal, M., 1998. Mapping of homologous interaction sites in the hepatitis B virus core protein. J. Virol. 72, 4997–5005 (https://doi.org/).

Koschel, M., Thomssen, R., Bruss, V., 1999. Extensive mutagenesis of the hepatitis B virus core gene and mapping of mutations that allow capsid formation. J. Virol. 73, 2153–2160 (https://doi.org/).

Kratz, P.A., Bottcher, B., Nassal, M., 1999. Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 1915–1920 (https://doi.org/).

Ladner, S.K., Otto, M.J., Barker, C.S., Zaifert, K., Wang, G.H., Guo, J.T., Seeger, C., 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 (https://doi.org/).

Lahlali, T., Berke, J.M., Vergauwen, K., Foca, A., Vandyck, K., Pauwels, F., Zoulim, F., Durantel, D., 2018. Novel Potent Capsid Assembly Modulators Regulate Multiple Steps of the Hepatitis B Virus Life-Cycle. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. https://doi.org/10.1128/aac.00835-18.

Lai, S.C., Devenish, R.J., 2012. LC3-Associated phagocytosis (LAP): connections with host autophagy. Cells 1, 396–408. https://doi.org/10.3390/cells1030396.

Lam, A.M., Ren, S., Espiritu, C., Kelly, M., Lau, V., Zheng, L., Hartman, G.D., Flores, O.A., Klumpp, K., 2017. Hepatitis B virus capsid assembly modulators, but not nucleoside analogs, inhibit the production of extracellular pregenomic RNA and spliced RNA variants. Antimicrob. Agents Chemother. 61. https://doi.org/10.1128/aac.00680-17.

Liang, T.J., Block, T.M., McMahon, B.J., Ghany, M.G., Urban, S., Guo, J.T., Locarnini, S., Zoulim, F., Chang, K.M., Lok, A.S., 2015. Present and future therapies of hepatitis B: from discovery to cure. Hepatology (Baltimore, Md.) 62, 1893–1908. https://doi.org/10.1002/hep.28025.

Ludgate, L., Liu, K., Luckenbaugh, L., Streck, N., Eng, S., Voitenleitner, C., Delaney, W.E.t., Hu, J., 2016. Cell-free hepatitis B virus capsid assembly dependent on the core protein C-terminal domain and regulated by phosphorylation. J. Virol. 90, 5830–5844. https://doi.org/10.1128/jvi.00394-16.

Mani, N., Cole, A.G., Phelps, J.R., Ardzinski, A., Cobarrubias, K.D., Cuconati, A., Dorsey, B.D., Evangelista, E., Fan, K., Guo, F., Guo, H., Guo, J.T., Harasym, T.O., Kadhim, S., Kultgen, S.G., Lee, A.C.H., Li, A.H.L., Long, Q., Majeski, S.A., Mao, R., McClintock, K.D., Reid, S.P., Rijnbrand, R., Snead, N.M., Micolochick Steuer, H.M., Stever, K., Tang, S., Wang, X., Zhao, Q., Sofia, M.J., 2018. Preclinical profile of AB-423, an inhibitor of hepatitis B virus pregenomic RNA encapsidation. Antimicrob. Agents Chemother. 62. https://doi.org/10.1128/aac.00082-18.

Nair, S., Li, L., Francis, S., Turner, W.W., VanNieuwenhze, M., Zlotnick, A., 2018. Use of a fluorescent analogue of a HBV core protein-directed drug to interrogate an antiviral mechanism. J. Am. Chem. Soc. 140, 15261–15269. https://doi.org/10.1021/jacs.8b07988.

Nassal, M., Junker-Niepmann, M., Schaller, H., 1990. Translational inactivation of RNA function: discrimination against a subset of genomic transcripts during HBV nucleocapsid assembly. Cell 63, 1357–1363 (https://doi.org/).

Neuveut, C., Wei, Y., Buendia, M.A., 2010. Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis. J. Hepatol. 52, 594–604. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.10.033.

Piver, E., Boyer, A., Gaillard, J., Bull, A., Beaumont, E., Roingeard, P., 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. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-311726.

Roingeard, P., Lu, S.L., Sureau, C., Freschlin, M., Arbeille, B., Essex, M., Romet-Lemonne, J.L., 1990a. Immunocytochemical and electron microscopic study of hepatitis B virus antigen and complete particle production in hepatitis B virus DNA transfected HepG2 cells. Hepatology (Baltimore, Md 11, 277–285 (https://doi.org/).

Roingeard, P., Romet-Lemonne, J.L., Leturcq, D., Goudeau, A., Essex, M., 1990b. Hepatitis B virus core antigen (HBc Ag) accumulation in an HBV nonproducer clone of HepG2-transfected cells is associated with cytopathic effect. Virology 179, 113–120 (https://doi.org/).

Roingeard, P., Sureau, C., 1998. Ultrastructural analysis of hepatitis B virus in HepG2-transfected cells with special emphasis on subviral filament morphogenesis. Hepatology (Baltimore, Md 28, 1128–1133. https://doi.org/10.1002/hep.510280431.

Schinazi, R.F., Ehteshami, M., Bassit, L., Asselah, T., 2018. Towards HBV curative therapies. Liver Int. : Off. J. Int. Assoc. Study Liver 38 (Suppl. 1), 102–114. https://doi.org/10.1111/liv.13656.

Seeger, C., Mason, W.S., 2015. Molecular biology of hepatitis B virus infection. Virology 479–480, 672–686. https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.031.

Sharma, R.R., Dhiman, R.K., Chawla, Y., Vasistha, R.K., 2002. Immunohistochemistry for core and surface antigens in chronic hepatitis. Trop. Gastroenterol. : Off. J. Digest. Dis. Found. 23, 16–19 (https://doi.org/).

Stray, S.J., Bourne, C.R., Punna, S., Lewis, W.G., Finn, M.G., Zlotnick, A., 2005. A heteroaryldihydropyrimidine activates and can misdirect hepatitis B virus capsid assembly. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102, 8138–8143. https://doi.org/10.1073/pnas.0409732102.

Testoni, B., Durantel, D., Zoulim, F., 2017. Novel targets for hepatitis B virus therapy.

Liver Int. : Off. J. Int. Assoc. Study Liver 37 (Suppl. 1), 33–39. https://doi.org/10.1111/liv.13307.
Tokuyasu, K.T., 1973. A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. J. Cell Biol. 57, 551–565 (https://doi.org/).
Venkatakrishnan, B., Katen, S.P., Francis, S., Chirapu, S., Finn, M.G., Zlotnick, A., 2016. Hepatitis B virus capsids have diverse structural responses to small-molecule ligands bound to the heteroaryldihydropyrimidine pocket. J. Virol. 90, 3994–4004. https://doi.org/10.1128/jvi.03058-15.
Venkatakrishnan, B., Zlotnick, A., 2016. The structural biology of hepatitis B virus: form and function. Ann. Rev. Virol. 3, 429–451. https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042238.
Vogel, M., Vorreiter, J., Nassal, M., 2005. Quaternary structure is critical for protein display on capsid-like particles (CLPs): efficient generation of hepatitis B virus CLPs presenting monomeric but not dimeric and tetrameric fluorescent proteins. Proteins 58, 478–488. https://doi.org/10.1002/prot.20312.
Webster, M., Witkin, K.L., Cohen-Fix, O., 2009. Sizing up the nucleus: nuclear shape, size and nuclear-envelope assembly. J. Cell Sci. 122, 1477–1486. https://doi.org/10.1242/jcs.037333.
Wu, G., Liu, B., Zhang, Y., Li, J., Arzumanyan, A., Clayton, M.M., Schinazi, R.F., Wang, Z., Goldmann, S., Ren, Q., Zhang, F., Feitelson, M.A., 2013. Preclinical characterization of GLS4, an inhibitor of hepatitis B virus core particle assembly. Antimicrob. Agents Chemother. 57, 5344–5354. https://doi.org/10.1128/aac.01091-13.
Yoo, I., Park, J.S., Kwon, K.C., Kim, S.E., Jin, X., Kim, H., Lee, J., 2012. Fluorescent viral nanoparticles with stable in vitro and in vivo activity. Biomaterials 33, 6194–6200. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.028.
Zhang, X., Lu, W., Zheng, Y., Wang, W., Bai, L., Chen, L., Feng, Y., Zhang, Z., Yuan, Z., 2016. In situ analysis of intrahepatic virological events in chronic hepatitis B virus infection. J. Clin. Investig. 126, 1079–1092. https://doi.org/10.1172/jci83339.
Zhao, Q., Hu, Z., Cheng, J., Wu, S., Luo, Y., Chang, J., Hu, J., Guo, J.T., 2018. Hepatitis B virus core protein dephosphorylation occurs during pregenomic RNA encapsidation. J. Virol. 92. https://doi.org/10.1128/jvi.02139-17.
Zhou, Z., Hu, T., Zhou, X., Wildum, S., Garcia-Alcalde, F., Xu, Z., Wu, D., Mao, Y., Tian, X., Zhou, Y., Shen, F., Zhang, Z., Tang, G., Najera, I., Yang, G., Shen, H.C., Young, J.A., Qin, N., 2017. Heteroaryldihydropyrimidine (HAP) and sulfamoylbenzamide (SBA) inhibit hepatitis B virus replication by different molecular mechanisms. Sci. Rep. 7, 42374. https://doi.org/10.1038/srep42374.

3. Résultat complémentaire de l'inhibiteur BAY 41-4109

L'interaction entre les inhibiteurs de **classe II** et HBc conduit à l'hydrolyse de celle-ci (Deres et al). Nous avons par conséquent voulu vérifier cette propriété dans nos conditions de traitement. Pour ceci, des cellules HuH-7 ont été transfectées avec un plasmide exprimant HBc puis ont été traitées avec différentes concentrations de BAY 41-4109 (0.5, 1, 5µM) pendant 48h. Les cellules ont ensuite été lysées, dosées et 50µg de protéines ont été mises à migrer en SDS-PAGE et révélées par western blot. Cette expérience a révélé une absence de dégradation visible de la protéine core dans nos conditions (Figure 47). Cette absence de dégradation a aussi pu être observé dans des travaux où les conditions sont semblables aux nôtres en termes de cellules, de contexte (HBc exprimée seule), de promoteur, de concentration, de temps de traitement, et de phénotypes associés (Nair et al. 2018). La dégradation a été décrite dans une autre étude comme étant un mécanisme protéasome dépendant pour cet inhibiteur, en utilisant des cellules dérivées de HepG2 exprimant de façon constitutive l'intégralité des protéines virales traitées sur de longues durées (Deres et al. 2003; Corcuera et al. 2018). Il est néanmoins possible que les protéines ainsi traitées soient en cours de dégradation et que l'on puisse toujours les détecter, de la même manière que les structures denses aux électrons HBc-positives observées en immunomarquage (Figure 45), correspondant aux structures amorphes en MET classique (Figure 46). Quoiqu'il en soit, ce résultat suggère que la dégradation de core puisse être dépendante d'autres facteurs que l'inhibiteur en lui-même.

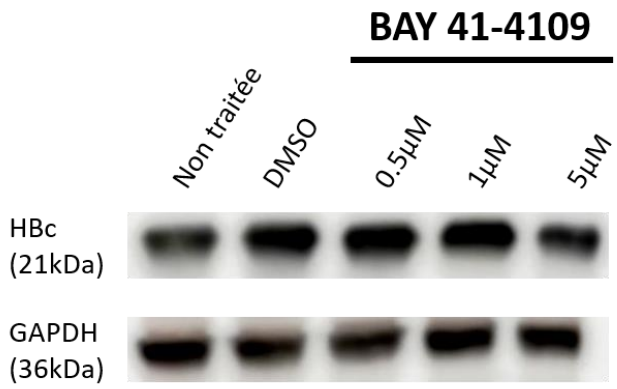


Figure 47 : Le traitement de cellules HuH-7 transfectées par le pHBc-WT avec le BAY 41-4109 n'aboutit pas à la dégradation d'HBc. Des cellules HuH-7 ont été traitées par du DMSO ou du BAY 41-4109 pendant 48h avant d'être lysées puis 50µg sont mises à migrer en SDS-PAGE. Les protéines sont transférées sur une membrane puis la core (HBc) et la GAPDH sont révélées par la HRP.

II. Etude d'un inhibiteur de classe I

En collaboration avec Raymond F. Schinazi et Franck Amblard de l'université de médecine d'Emory, nous avons pu étudier un inhibiteur de **classe I** : le GLP-26. La **classe I** n'empêche pas l'assemblage de la capside mais prévient l'encapsidation, ce qui aboutit à la formation de capsides vides. Cette classe fait également parti des modulateurs de l'assemblage en cours de développement, et par conséquent nous avons étudié son phénotype en milieu cellulaire. Le GLP-26 possède un effet sur la réplication du VHB en modèle murin (Amblard et al. 2019; Hurwitz et al. 2021). Les travaux de nos collaborateurs ont montré, de façon surprenante, que l'utilisation de cet inhibiteur *in vitro* sur l'HBc-NTD conduisait à une augmentation de sa stabilité comparable à celle induite par un inhibiteur de **classe II**, aboutissant à la formation de capsides ouvertes et malformées (Amblard et al. 2019). Ce phénomène intéressant l'est d'autant plus que cette molécule possède une structure chimique comparable à la **classe I**, et est considérée comme un dérivé de la famille des SBA. Nous avons donc voulu élucider cette problématique par une étude de son phénotype en cellules via une HBc complète afin de confirmer ou non son appartenance à la **classe I**. La **classe I** a été montrée comme provoquant un phénotype d'accumulation cytoplasmique de la core et conduit à la formation de capsides morphologiquement comparables aux capsides natives (Corcuera et al. 2018; Zhou et al. 2017, 2; Feld et al. 2007; Schlicksup et al. 2020). Au contraire, la **classe II** est caractérisée par la formation d'agrégats précédemment décrits comme comportant un matériel amorphe, et des structures cristallines composées de capsides complètes (Rat et al. 2019; Nair et al. 2018; Corcuera et al. 2018). C'est en utilisant ces différences phénotypiques que nous avons voulu investiguer l'appartenance à une classe ou à l'autre du GLP-26.

Dans une première approche, nous avons voulu mesurer la dégradation potentielle de la protéine core induite par cet inhibiteur. Pour ceci, des cellules HepAD38 exprimant constitutivement la protéine core ont été traitées pendant 48h avec 1% de DMSO ou des concentrations différentes (0.5, 1, 5µM) de GLP-26. Les cellules ont été lysées après les 48h de traitements, et 50µg de protéines ont été mises à migrer en SDS-PAGE et révélées en western blot (Figure 48). Nous observons que la quantité de protéines core ne semble pas être affectée par l'utilisation du DMSO en HepAD38, qui sert à diluer le GLP-26, ni même par l'utilisation du GLP-26 à différentes concentrations (Figure 48). Ce premier résultat est totalement comparable aux résultats obtenus dans la littérature qui montrent en cellules HepAD38 une absence de dégradation pour la **classe I** (Corcuera et al. 2018). Toutefois, étant donné nos

précédents résultats suggérant un effet du temps de traitement sur la dégradation, nous nous sommes intéressés à d'autres caractéristiques phénotypiques.

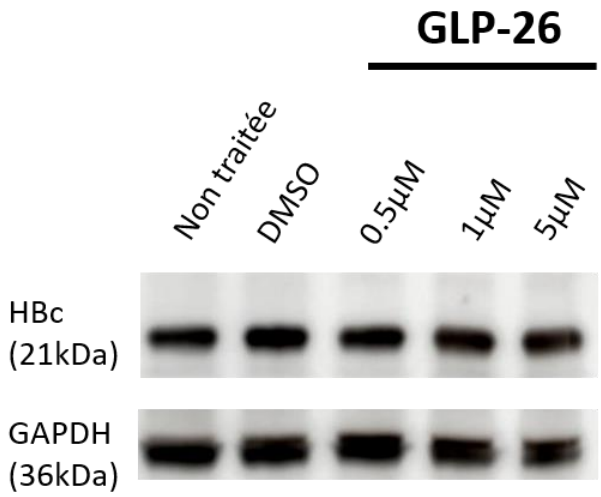


Figure 48 : Le GLP-26 n'induit pas de dégradation de la protéine core. Des cellules HepAD38 sont traitées 48h avec du DMSO ou du GLP-26. Les cellules ont été lysées puis 50µg de protéines ont été mises à migrer en SDS-PAGE avant de révéler la protéine de capside (HBc) et la GAPDH par un anti-core et un anti-GAPDH, et un marquage secondaire couplé à l'HRP.

Le second point qui a été noté dans la littérature en tant que différence entre les classes est le phénotype de localisation, et d'agrégation, de la protéine core. Pour étudier cela, différentes lignées cellulaires (HuH-7 et HepAD38) et différents plasmides (pHBc-WT et pHBV1.1) ont été utilisés, ces cellules ont ensuite été traitées par le GLP-26 à 5µM pendant 48h puis fixées et l'HBc a été marqué par un anti-core et révélé par un anticorps secondaire couplé à un Alexa 488. Tout d'abord, nous avons étudié l'effet du GLP-26 en contexte non réplicatif. Des cellules HuH-7 ont été transfectées par un plasmide exprimant l'HBc sauvage puis traitées par le GLP-26 (Figure 49, (b)). De manière intéressante, ces cellules ne présentent pas de relocalisation de core ni d'agrégation. Au contraire, lorsque les cellules HuH-7 sont transfectées par un plasmide exprimant l'intégralité des facteurs viraux avant d'être traitées par le GLP-26 (Figure 49, (d)), nous observons un phénotype d'accumulation cytoplasmique de la protéine core. Afin de compléter ce résultat, nous avons traité des cellules HepAD38 avec le GLP-26 (Figure 49, (f)) et avons également observé de façon très claire cette accumulation cytoplasmique d'HBc. Ces deux conditions réplicatives montrent que, de façon indépendante de la lignée cellulaire, le GLP-26 induit une accumulation dans le cytoplasme de la protéine

core, comme il a été décrit dans la littérature pour la **classe I** (Corcuera et al. 2018) et ce de façon nettement moins agrégée que la **classe II** précédemment décrite.

Par ailleurs, il faut noter que les HepAD38 ont été cultivées sans tétracycline, et par conséquent, expriment le VHB en permanence. Il est donc probable que des capsides soient déjà formées dans ces cellules avant le traitement. Au contraire, le pHBV1.1 a été transfecté, et le milieu a été changé par un milieu contenant le GLP-26 6h après (comme précédemment décrit (Rat et al. 2019; Amblard et al. 2019)). Ces cellules sont en cours d'expression lorsqu'elles sont mises en présence du GLP-26, et par conséquent il est probable que les capsides soient en cours de formation. Par conséquent, l'inhibiteur semble pouvoir provoquer ce phénotype sur des capsides en formation (pHBV1.1) mais également sur des capsides préformées (HepAD38). La raison pour laquelle cet inhibiteur n'induit pas de modification de la localisation en contexte non réplicatif reste toutefois peu claire et cela sera développé dans la discussion. Finalement ces résultats suggèrent l'appartenance de cet inhibiteur à la **classe I**. Afin d'étudier plus en profondeur les mécanismes de cet inhibiteur, nous nous sommes posé la question de son impact sur l'assemblage en utilisant le système précédemment décrit nous permettant par FRET-FLIM de décrire la condensation et l'oligomérisation de la core (Rat et al. 2020).

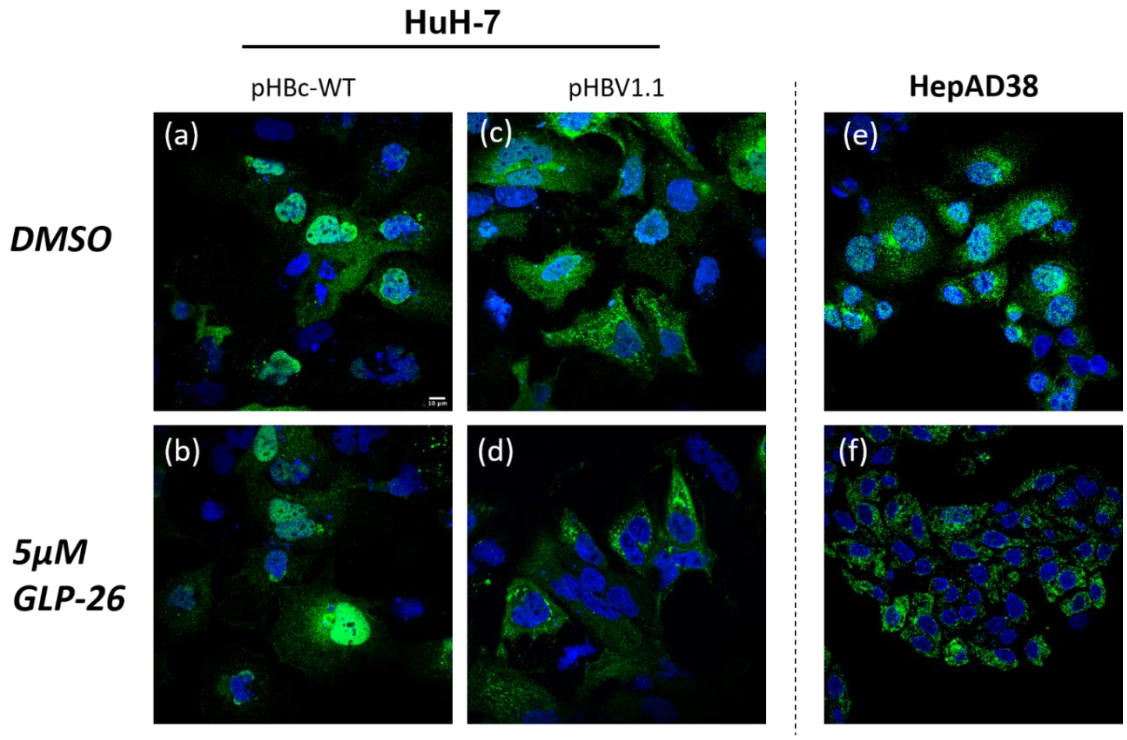


Figure 49 : Le GLP-26 provoque un phénotype d'accumulation cytoplasmique en contexte réplicatif. Des cellules HuH-7 transfectées avec du pHBc-WT (a,b) ou du pHBV1.1 (c,d) ont été traitées à partir de 6h post-transfection avec 1% de DMSO ou 5µM de GLP-26, pendant 48h. (e et f) Des cellules HepAD38 ont été traitées pendant 48h avec 1% de DMSO ou 5µM de GLP-26. Après fixation des cellules, la protéine core est marquée par un anti-core et révélée par un Alexa 488. Ces images sont une superposition du canal bleu (noyau) et du canal vert (HBc) et sont représentative du phénotype majoritaire observé dans les cellules.

Des cellules HuH-7 ont donc été transfectées par un mélange d'HBc/HBc-eGFP/HBc-mCherry (ratio 0.7/0.1/0.2) puis traitées 6h après par 5µM de GLP-26. L'efficacité de FRET a donc été mesurée comme il a été précédemment décrit (Figure 34). La core possède une efficacité de FRET d'environ 30% traitée par le DMSO et également en traitement par le GLP-26. D'autres expériences utilisant des temps de traitement beaucoup plus long (jusque 7 jours) n'ont également pas montré de différences d'efficacité de FRET (non montrées). Par conséquent, ce résultat suggère que cet inhibiteur n'altère pas l'assemblage de la capside dans ces conditions (Figure 50). Néanmoins, bien que cela soit en accord avec la littérature (Corcuera et al. 2018; Zhou et al. 2017; Feld et al. 2007; Schlicksup et al. 2020), il aurait été pertinent de compléter cette expérience par une seconde expérience en complexe réplicatif, en y ajoutant un plasmide pHBV1.1ΔC qui exprime toutes les protéines virales à l'exception faite de la core. De plus ces données de FLIM doivent être complétées par une expérience de MET afin de confirmer la bonne formation de capsides.

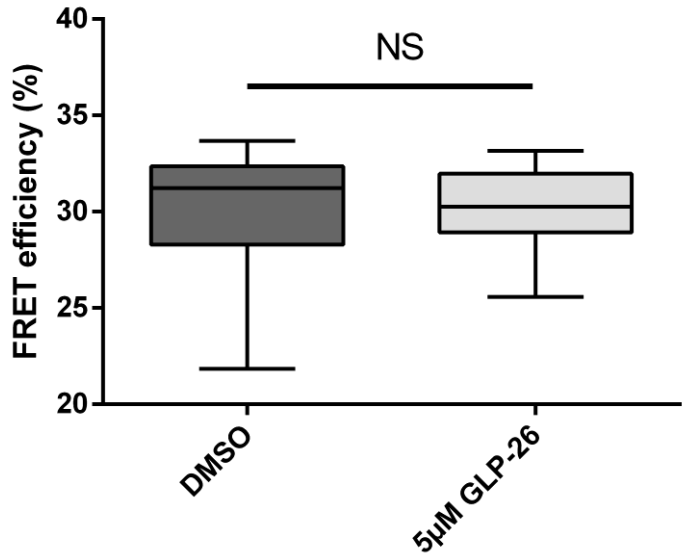


Figure 50 : Analyse des capsides traitées par le GLP-26. Des cellules HuH-7 sont transfectées par un mélange contenant 70% de pHBc-WT, 20% de pHBc-mCherry et 10% de pHBc-eGFP. 6h post-transfection, les cellules sont traitées par du DMSO ou 5µM de GLP-26 pendant 48h. Le temps de vie de l'eGFP issu d'un mélange HBc/HBc-eGFP (ratio 0.7/0.3) est comparé avec le temps de vie de l'eGFP issu d'un mélange HBc/HBc-eGFP/HBc-mCherry (ratio 0.7/0.1/0.2) afin d'en définir l'efficacité de FRET comme précédemment décrit (Rat et al. 2020). Un test t a été fait pour comparer l'efficacité de FRET de 50 cellules par condition.

Finalement nos travaux sur cet inhibiteur, le GLP-26, montrent que celui-ci ne provoque pas la dégradation d'HBc (Figure 48), mais l'accumulation cytoplasmique dépendante du contexte réplicatif de core (Figure 49). Enfin nous montrons que cet inhibiteur ne provoque pas de changement significatif de l'efficacité de FRET associée à la protéine core (Figure 50). L'ensemble de ces résultats montrent que cet inhibiteur se comporte davantage comme les modulateurs de **classe I** en milieu cellulaire.

III. Discussion sur l'étude des CpAMs

La découverte de la structure tridimensionnelle d'HBc a ouvert la voie au développement de molécules dirigées contre la protéine core du VHB avec un potentiel antiviral élevé. Nous avons investigué l'impact d'une molécule de **classe II** de la famille des HAP sur HBc en cellules, en traitant par le BAY 41-4109 des HuH-7 exprimant HBc et en évaluant la localisation intracellulaire et l'agrégation d'HBc. Nous confirmons dans ces travaux que la famille HAP induit la formation de grands amas d'HBc de manière temps et concentration dépendante (Corcuera et al. 2018; Lahlali et al. 2018; Huber et al. 2018; Nair et al. 2018; Nair et Zlotnick 2021). Toutefois, la distribution de ces amas est variable dans la littérature, avec l'accumulation à la fois dans le noyau (Corcuera et al. 2018; Huber et al. 2018; Lahlali et al. 2018) et dans le cytoplasme ((Nair et Zlotnick 2021; Nair et al. 2018) et dans ces travaux (Figure 43, A et B). Cette hétérogénéité de la distribution des agrégats d'HBc pourrait être due aux conditions expérimentales de nos travaux, étant donné que nous avons utilisé de faibles concentrations de BAY 41-4109 et des temps de traitements courts. D'autres études observent une accumulation nucléaire en utilisant des composés avec le backbone HAP mais entouré de différents groupements chimiques (Huber et al. 2018). Néanmoins, des études structurales ont montré que diverses molécules de la famille des HAP pouvaient interagir différemment avec HBc (Klumpp et al. 2015; Zhou et al. 2017), ce qui résulte en des effets différents sur la structure de la capside (C. R. Bourne, Finn, et Zlotnick 2006, 20; Katen et al. 2013; Venkatakrishnan et Zlotnick 2016). Toutefois, la raison pour laquelle les agrégats d'HBc sont retrouvés principalement dans le cytoplasme de cellules traitées par le BAY 41-4109 lorsque HBc est retrouvé dans le noyau de cellules non traitées reste peu claire (Figure 43). Quoiqu'il en soit, l'agrégation d'HBc médiée par le BAY 41-4109 suit une cinétique très rapide (C. Bourne et al. 2008), telle que la population cytoplasmique d'HBc pourrait s'agréger immédiatement après l'entrée du BAY-41-4109 dans la cellule. De plus, HBc est traduite dans le cytoplasme (Blondot, Bruss, et Kann 2016), où les protéines sont capturées par le processus d'agrégation, ce qui déplace l'équilibre du noyau vers le cytoplasme. Par conséquent, le BAY 41-4109 pourrait être piégé dans ces amas d'HBc cytoplasmiques et des temps plus longs ou des concentrations plus hautes pourraient être requises pour que l'inhibiteur puisse atteindre le compartiment nucléaire. Zlotnick et al. ont récemment décrit une HAP fluorescente qui s'accumule dans le cytoplasme (Nair et Zlotnick 2021; Nair et al. 2018). Par ailleurs, l'absence de dégradation que nous observons dans nos conditions (Figure 47), en cohérence avec ces travaux de l'équipe de Zlotnick, pourrait provoquer cet effet, à un niveau où l'HBc s'accumulerait continuellement dans le cytoplasme, sans issue possible étant donné la

dégradation moindre à ces faibles durées de traitement. De manière intéressante, les travaux de Nair et al. montrent également une absence de dégradation en utilisant une HAP différente mais dans des conditions très similaires aux nôtres. Pour des temps de traitement plus longs et des concentrations élevées, les résultats de toutes les études convergent vers l'observation de grands agrégats principalement, mais pas exclusivement, localisés dans le noyau. Toutefois, nos travaux remettent en doute cette localisation des agrégats nucléaires (Corcuera et al. 2018; Huber et al. 2018). De manière cohérente avec la taille des agrégats (2-3µm, Figure 43, C), nous avons trouvé de grands amas d'HBc localisés à la périphérie du noyau, partiellement encerclés par des invaginations de l'enveloppe nucléaire (Figure 44, 45, 46). Toutefois, il est possible que le temps de traitement, ou la surexpression par un promoteur CMV que nous utilisons ne permette pas la dégradation et l'accumulation nucléaire, étant donné les longues durées de traitement utilisées en cellules dérivées d'HepG2 exprimant de manière constitutive le VHB dans la littérature (Deres et al. 2003; Corcuera et al. 2018; Huber et al. 2018).

Nous avons alors investigué la structure des amas d'HBc. Dans les études utilisant l'HBc-NTD purifiée, les HAP provoquent un assemblage incorrect de la protéine tronquée de son domaine C-terminal, ce qui résulte en une formation de capsides irrégulières, ouvertes, en structures en feuillets et en tubes (C. Bourne et al. 2008; Klumpp et al. 2015; Stray et al. 2005; Venkatakrishnan et Zlotnick 2016; Zhou et al. 2017). Nous fournissons au cours de nos travaux, pour la première fois dans un contexte cellulaire et en utilisant la protéine core complète, une vision très différente de l'ultrastructure des agrégats d'HBc. Nous avons observé deux morphologies principales. Les capsides semblent garder leur forme native, mais plutôt que d'être dispersées à travers la cellule en tant que particules seules, elles sont retrouvées agrégées ensemble, parfois côte à côte ou superposées (Figure 46). Ces agrégations de capsides intactes qui n'ont pas été observées *in vitro* avec l'HBc-NTD pourraient refléter un mécanisme différent de l'altération de l'assemblage induite par le BAY 41-4109. En effet, le CTD, avec plusieurs partenaires cellulaires potentiels, participe à la cinétique d'assemblage d'HBc, et permet la stabilisation de la capside, de manière opposée à l'action déstabilisatrice de la capside native par le BAY 41-4109 (Rat et al. 2020; Ludgate et al. 2016; S. Wang et al. 2019). Dans l'autre morphologie retrouvée dans les amas, nous avons observé une structure dense aux électrons, identifiée comme une agrégation amorphe de protéines core (Figures 45, 46). Cette structure pourrait correspondre à l'agrégation d'oligomères d'HBc piégés dans un état déficient pour l'assemblage, en corrélation avec la capacité du BAY 41-4109 à promouvoir les interactions protéine-protéine (Venkatakrishnan et Zlotnick 2016). Alternativement, cela pourrait

correspondre à des fragments d'HBc hydrolysés, de manière cohérente avec les résultats décrits auparavant (Deres et al. 2003; Huber et al. 2018). De manière intéressante, les deux morphologies sont généralement associées, dans la même zone dense aux électrons des cellules, suggérant que le BAY 41-4109 pourrait provoquer une compression, et une rupture de la capside afin de générer ces matériaux protéiques amorphes retrouvés dans les agrégats. Alternativement, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que le BAY 41-4109 piège à la fois des protéines core non assemblées avec des capsides préformées, menant à l'association de ces deux structures dans les mêmes zones de la cellule. En effet, il a été montré que l'effet de cet inhibiteur était dépendant de la stœchiométrie (Stray et Zlotnick 2006). Plus précisément, il est donc possible que le BAY 41-4109 puisse provoquer la formation d'intermédiaires bloqués dans un état déficient pour l'assemblage à des stœchiométries >1drogue/dimère qui piègeraient, via l'agrégation, des capsides affectées par des concentrations substoechiométriques (<1drogue/dimère).

Finalement, nous avons montré que le BAY 41-4109 induisait l'agrégation d'HBc, principalement dans le cytoplasme et que les agrégats formés à la périphérie du noyau étaient partiellement entourés d'invaginations de l'enveloppe nucléaire. Ces agrégats d'HBc consistent en des structures capsidiques agrégées ensemble et mélangées avec des fragments de protéines core. Bien que cette molécule ne soit pas actuellement utilisée en clinique, la compréhension des mécanismes d'action pourrait servir en tant que base de comparaison avec les autres modulateurs de l'assemblage actuellement en développement et pour certains en essais cliniques.

En collaboration avec Franck Amblard et Raymond F. Schinazi, nous avons ensuite étudié le GLP-26 qui fait partie d'une nouvelle famille dérivée des glyoxamides. Cet inhibiteur possède un effet antiviral important, et les travaux de nos collaborateurs ont montré, en souris humanisées, que l'association de cet inhibiteur avec l'Entecavir induit la diminution de la charge virale qui devient pour la moitié des souris indétectable après 10 semaines. Le traitement d'HBc pendant son assemblage aboutit *in vitro* à la formation de capsides malformées et ouvertes, ce qui est étonnant étant donné que cet inhibiteur est un dérivé des SBA, de **classe I**. Nous avons montré que cet inhibiteur n'induisait pas de dégradation de la protéine core (Figure 48), mais une accumulation de la core dans le cytoplasme en contexte réplicatif (Figure 49) sans empêcher l'oligomérisation de la protéine core (Figure 50). Ces différents phénotypes s'accordent pour une orientation de cet inhibiteur davantage vers la **classe I**, en contraste avec les résultats obtenus *in vitro* (Berke et al. 2017; Corcuera et al. 2018; Katen et al. 2010; Zhou

et al. 2017). Cette divergence avec les observations *in vitro* pourrait s'expliquer par un rôle du CTD, à nouveau, bien que nous n'ayons pas fait d'observation en MET. Cette expérience en microscopie électronique reste donc à être faite afin de confirmer l'appartenance du GLP-26 à la **classe I**. Néanmoins ce genre de différence en cellules et *in vitro* a déjà été montrée et argumentée dans nos précédents travaux (Rat et al. 2020; 2019).

La différence de phénotype en contexte réplicatif et non réplicatif (Figure 49) indique que les protéines virales possèdent un rôle dans la clairance d'HBc du noyau. Nous n'avons néanmoins pas identifié le facteur responsable de ce phénotype. Il serait donc intéressant de faire des mutations sur un plasmide de type pHBV1.1 afin de supprimer l'expression des protéines virales unes à unes, ou encore d'utiliser des ARN interférents en cellules HepAD38 afin d'identifier les facteurs viraux responsables de cet effet. Une hypothèse possible serait l'interaction avec les protéines d'enveloppe. En effet la présence de la protéine L permet la relocalisation de la protéine core hors du noyau (Pastor et al. 2019). Il est également connu que le mutant F97L, localisé dans la poche hydrophobe de la core, cible des CpAMs, permet un enveloppement précoce. En parallèle il a également été montré que le Triton X-100 se liait à la poche hydrophobe et pouvait prévenir l'enveloppement (Lecoq et al. 2021; Yuan et al. 1999). Il est, par conséquent, tentant d'imaginer que les inhibiteurs de **classe II** puissent augmenter la cinétique d'association de particules de core avec les protéines d'enveloppe. Ce mécanisme conduirait alors à un déséquilibre qui provoquerait l'accumulation cytoplasmique de la protéine core. Il serait donc intéressant d'étudier les colocalisations entre la core et la protéine d'enveloppe L sous traitements par le GLP-26.

CONCLUSION

Au cours de ces travaux de thèse j'ai pu travailler sur différents aspects du VHB : l'assemblage de la capside, la mise au point d'un modèle d'étude de l'interaction core-ARNpg et la caractérisation de modulateurs de l'assemblage. Afin d'étudier l'assemblage du VHB j'ai pu mettre au point une association d'outils permettant d'établir une relation structure-activité de la core par microscopie en milieu cellulaire. Nous avons ainsi utilisé ces outils pour montrer le caractère indispensable du domaine C-terminal (Rat et al. 2020). Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation de mutations ponctuelles comme les mutants HBcY132A et F97L ou les mutations de phosphorylation. Ces résultats devraient être complétés par des approches de cinétique permettant de suivre à des temps très courts l'assemblage de la protéine core. Pour cela, nous pourrions micro-injecter les plasmides et étudier 30 à 60 minutes plus tard par FCS et FLIM la formation des capsides. En parallèle de ces travaux nous avons tenté d'étudier les interactions entre la core et l'ARNpg dépendante de la polymérase. La large proportion de capsides vides a néanmoins été un obstacle important à la mise au point d'outils appropriés et nous n'avons pas, à ce jour, réussi à établir une méthodologie appropriée.

J'ai également travaillé sur un second axe de recherche plus appliqué qui s'attachait à la caractérisation de modulateurs allostériques de l'assemblage du virus de l'hépatite B. La collaboration avec Fabien Zoulim et Barbara Testoni nous a permis d'étudier un inhibiteur de classe II, le BAY 41-4109, en milieu cellulaire (Rat et al. 2019). Cet inhibiteur induit la formation d'agrégats cytoplasmiques à basse concentration. A plus haute concentration ces agrégats se relocalisent dans le noyau, et nous observons la présence de petits agrégats nucléaires et d'agrégats plus larges invaginant l'enveloppe nucléaire. Nous avons pu détailler la structure de ces amas protéiques et nous observons la présence d'un matériel amorphe et de structures cristallines encerclés d'une membrane. Nous avons complété ces travaux par l'étude de la dégradation de la protéine core, qui n'est pas visible par western blot.

J'ai ensuite travaillé en collaboration avec Raymond F. Schinazi et Franck Amblard sur la caractérisation d'une nouvelle famille de modulateurs dérivés des glyoxamides : le GLP-26 (Amblard et al. 2019). Nous avons montré que cet inhibiteur n'induit pas la dégradation de la core et ne modifie pas l'oligomérisation. Ces propriétés nous conduisent à associer le GLP-26 à la classe I. Par ailleurs cet inhibibiteur provoque une localisation exclusivement cytoplasmique de la protéine core en contexte réplicatif. Cette modification du trafic interacellulaire d'HBc pourrait être due à un défaut de transport rétrograde ou à un enveloppement plus précoce de la capside.

Ces travaux ont permis une meilleure compréhension des mécanismes d'assemblage de la capside et des effets des CpAMs et, par conséquent, pourraient contribuer à davantage d'études permettant de participer au développement des thérapies en essais cliniques. De plus, j'ai pu au cours de ces travaux de thèse faire une association entre la recherche fondamentale et appliquée, *via* l'association d'outils et d'idées provenant de l'étude de l'assemblage avec l'étude d'une molécule en essais précliniques. Enfin, la microscopie a été ici mise à l'honneur, et montre à nouveau des exemples de son apport pour l'étude de mécanismes fondamentaux des virus et leur application.

Acs, G., M. A. Sells, R. H. Purcell, P. Price, R. Engle, M. Shapiro, et H. Popper. 1987. « Hepatitis B Virus Produced by Transfected Hep G2 Cells Causes Hepatitis in Chimpanzees. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84 (13): 4641-44. https://doi.org/10.1073/pnas.84.13.4641.

Albertazzi, Lorenzo, Daniele Arosio, Laura Marchetti, Fernanda Ricci, et Fabio Beltram. 2009. « Quantitative FRET Analysis With the E ^{0} GFP-MCherry Fluorescent Protein Pair ». *Photochemistry and Photobiology* 85 (1): 287-97. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00435.x.

Alberti, A., S. Diana, G.H. Scullard, A.L.W.F. Eddleston, et Roger Williams. 1978. « Full and Empty Dane Particles in Chronic Hepatitis B Virus Infection: Relation to Hepatitis B e Antigen and Presence of Liver Damage ». *Gastroenterology* 75 (5): 869-74. https://doi.org/10.1016/0016-5085(78)90472-9.

Alexander, C. G., M. C. Jurgens, D. A. Shepherd, S. M. V. Freund, A. E. Ashcroft, et N. Ferguson. 2013. « Thermodynamic Origins of Protein Folding, Allostery, and Capsid Formation in the Human Hepatitis B Virus Core Protein ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (30): E2782-91. https://doi.org/10.1073/pnas.1308846110.

Allweiss, Lena, et Maura Dandri. 2016. « Experimental in Vitro and in Vivo Models for the Study of Human Hepatitis B Virus Infection ». *Journal of Hepatology* 64 (1): S17-31. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.012.

Amblard, Franck, Sebastien Boucle, Leda Bassit, Bryan Cox, Ozkan Sari, Sijia Tao, Zhe Chen, et al. 2019. « Novel Hepatitis B Virus Capsid Assembly Modulator Induces Potent Antiviral Responses *In Vitro* and in Humanized Mice ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 64 (2): e01701-19, /aac/64/2/AAC.01701-19.atom. https://doi.org/10.1128/AAC.01701-19.

Argos, Patrick. 1988. « A Sequence Motif in Many Polymerases ». *Nucleic Acids Research* 16 (21): 9909-16. https://doi.org/10.1093/nar/16.21.9909.

Asor, Roi, Christopher John Schlicksup, Zhongchao Zhao, Adam Zlotnick, et Uri Raviv. 2020. « Rapidly Forming Early Intermediate Structures Dictate the Pathway of Capsid Assembly ». *Journal of the American Chemical Society* 142 (17): 7868-82. https://doi.org/10.1021/jacs.0c01092.

Asselah, Tarik. 2019. « Targets and Future Direct-Acting Antiviral Approaches to Achieve Hepatitis B Virus Cure » 4: 10.

Bardens, Andreas, Tatjana Döring, Jens Stieler, et Reinhild Prange. 2011. « Alix Regulates Egress of Hepatitis B Virus Naked Capsid Particles in an ESCRT-Independent Manner: Alix Mediates HBV Capsid Release ». *Cellular Microbiology* 13 (4): 602-19. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01557.x.

Bartenschlager, R, M Junker-Niepmann, et H Schaller. 1990. « The P Gene Product of Hepatitis B Virus Is Required as a Structural Component for Genomic RNA Encapsidation ». *Journal of Virology* 64 (11): 5324-32. https://doi.org/10.1128/jvi.64.11.5324-5332.1990.

Bartenschlager, R, et H Schaller. 1992. « Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. » *The EMBO Journal* 11 (9): 3413-20.

Basagoudanavar, Suresh H., David H. Perlman, et Jianming Hu. 2007. « Regulation of Hepadnavirus Reverse Transcription by Dynamic Nucleocapsid Phosphorylation ». *Journal of Virology* 81 (4): 1641-49. https://doi.org/10.1128/JVI.01671-06.

Bazinet, Michel, Victor Pântea, Gheorghe Placinta, Iurie Moscalu, Valentin Cebotarescu, Lilia Cojuhari, Pavlina Jimbei, et al. 2020. « Safety and Efficacy of 48 Weeks REP 2139 or REP 2165, Tenofovir Disoproxil, and Pegylated Interferon Alfa-2a in Patients With Chronic HBV Infection Naïve to Nucleos(t)Ide Therapy ». *Gastroenterology* 158 (8): 2180-94. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.02.058.

Beck, Juergen, et Michael Nassal. 2007. « Hepatitis B Virus Replication », 17.

Berke, Jan Martin, Pascale Dehertogh, Karen Vergauwen, Wendy Mostmans, Koen Vandyck, Pierre Raboisson, et Frederik Pauwels. 2020. « Antiviral Properties and Mechanism of Action Studies of the Hepatitis B Virus Capsid Assembly Modulator JNJ-56136379 ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 64 (5): e02439-19, /aac/64/5/AAC.02439-19.atom. https://doi.org/10.1128/AAC.02439-19.

Berke, Jan Martin, Pascale Dehertogh, Karen Vergauwen, Ellen Van Damme, Wendy Mostmans, Koen Vandyck, et Frederik Pauwels. 2017. « Capsid Assembly Modulators Have a Dual Mechanism of Action in Primary Human Hepatocytes Infected with Hepatitis B Virus ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (8). https://doi.org/10.1128/AAC.00560-17.

Blanchet, Matthieu, Vigigah Sinnathamby, Andrew Vaillant, et Patrick Labonté. 2019. « Inhibition of HBsAg Secretion by Nucleic Acid Polymers in HepG2.2.15 Cells ». *Antiviral Research* 164 (avril): 97-105. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.02.009.

Blondot, Marie-Lise, Volker Bruss, et Michael Kann. 2016. « Intracellular Transport and Egress of Hepatitis B Virus ». *Journal of Hepatology* 64 (1): S49-59. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.008.

Boni, Carolina, Andrea Vecchi, Marzia Rossi, Diletta Laccabue, Tiziana Giuberti, Arianna Alfieri, Pietro Lampertico, et al. 2018. « TLR7 Agonist Increases Responses of Hepatitis B Virus–Specific T Cells and Natural Killer Cells in Patients With Chronic Hepatitis B Treated With Nucleos(T)Ide Analogues ». *Gastroenterology* 154 (6): 1764-1777.e7. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.01.030.

Böttcher, Bettina, et Michael Nassal. 2018. « Structure of Mutant Hepatitis B Core Protein Capsids with Premature Secretion Phenotype ». *Journal of Molecular Biology* 430 (24): 4941-54. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.10.018.

Bou-Nader, Charles, Frauke Muecksch, Janae B. Brown, Jackson M. Gordon, Ashley York, Chen Peng, Rodolfo Ghirlando, Michael F. Summers, Paul D. Bieniasz, et Jinwei Zhang. 2021. « HIV-1 Matrix-TRNA Complex Structure Reveals Basis for Host Control of Gag Localization ». *Cell Host & Microbe*, août, S1931312821003395. https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.07.006.

Bourne, Christina, Sejin Lee, Bollu Venkataiah, Angela Lee, Brent Korba, M. G. Finn, et Adam Zlotnick. 2008. « Small-Molecule Effectors of Hepatitis B Virus Capsid Assembly Give Insight into Virus Life Cycle ». *Journal of Virology* 82 (20): 10262-70. https://doi.org/10.1128/JVI.01360-08.

Bourne, Christina R., M. G. Finn, et Adam Zlotnick. 2006. « Global Structural Changes in Hepatitis B Virus Capsids Induced by the Assembly Effector HAP1 ». *Journal of Virology* 80 (22): 11055-61. https://doi.org/10.1128/JVI.00933-06.

Bourne, Christina R., Sarah P. Katen, Matthew R. Fulz, Charles Packianathan, et Adam Zlotnick. 2009. « A Mutant Hepatitis B Virus Core Protein Mimics Inhibitors of Icosahedral Capsid Self-Assembly † ». *Biochemistry* 48 (8): 1736-42. https://doi.org/10.1021/bi801814y.

Bruss, V., et D. Ganem. 1991. « The Role of Envelope Proteins in Hepatitis B Virus Assembly. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88 (3): 1059-63. https://doi.org/10.1073/pnas.88.3.1059.

Budkowska, Agata, J Wai-Kuo Shih, et John L Gerin. 1977. « Immunochemistry and Polypeptide Composition of Hepatitis B Core Antigen (HB c Ag) », 7.

Cabantous, Stéphanie, Hau B. Nguyen, Jean-Denis Pedelacq, Faten Koraïchi, Anu Chaudhary, Kumkum Ganguly, Meghan A. Lockard, Gilles Favre, Thomas C. Terwilliger, et Geoffrey S. Waldo. 2013. « A New Protein-Protein Interaction Sensor Based on Tripartite Split-GFP Association ». *Scientific Reports* 3 (1): 2854. https://doi.org/10.1038/srep02854.

Cabantous, Stéphanie, Thomas C Terwilliger, et Geoffrey S Waldo. 2005. « Protein Tagging and Detection with Engineered Self-Assembling Fragments of Green Fluorescent Protein ». *Nature Biotechnology* 23 (1): 102-7. https://doi.org/10.1038/nbt1044.

Caisse nationale de l'assurance maladie des travailleurs salariés (France), Christine Meffre, Centre technique d'appui et de formation des centres d'examens de santé (France), et Institut de veille sanitaire (France). 2007. *Prévalence des hépatites B et C en France en 2004*. Saint-Maurice: Institut de veille sanitaire.

Ceres, Pablo, Stephen J. Stray, et Adam Zlotnick. 2004. « Hepatitis B Virus Capsid Assembly Is Enhanced by Naturally Occurring Mutation F97L ». *Journal of Virology* 78 (17): 9538-43. https://doi.org/10.1128/JVI.78.17.9538-9543.2004.

Chabrolles, Hélène, Héloïse Auclair, Serena Vegna, Thomas Lahlali, Caroline Pons, Maud Michelet, Yohann Couté, et al. 2020. « Hepatitis B Virus Core Protein Nuclear Interactome Identifies

SRSF10 as a Host RNA-Binding Protein Restricting HBV RNA Production ». Édité par Jianming Hu. *PLOS Pathogens* 16 (11): e1008593. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008593.

Chemin, I., et F. Zoulim. 2009. « Hepatitis B Virus Induced Hepatocellular Carcinoma ». *Cancer Letters* 286 (1): 52-59. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.12.003.

Chen, Chao, Joseph Che-Yen Wang, Elizabeth E. Pierson, David Z. Keifer, Mildred Delaleau, Lara Gallucci, Christian Cazenave, Michael Kann, Martin F. Jarrold, et Adam Zlotnick. 2016. « Importin β Can Bind Hepatitis B Virus Core Protein and Empty Core-Like Particles and Induce Structural Changes ». Édité par Jianming Hu. *PLOS Pathogens* 12 (8): e1005802. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005802.

Chen, Chao, Joseph Che-Yen Wang, et Adam Zlotnick. 2011. « A Kinase Chaperones Hepatitis B Virus Capsid Assembly and Captures Capsid Dynamics in vitro ». *PLoS Pathogens* 7 (11). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002388.

Chen, Jiang-Yan, Chun-yang Gan, Xue-fei Cai, Wen-lu Zhang, Quan-xin Long, Xia-fei Wei, Yuan Hu, et al. 2018. « Fluorescent Protein Tagged Hepatitis B Virus Capsid Protein with Long Glycine-Serine Linker That Supports Nucleocapsid Formation ». *Journal of Virological Methods* 255 (mai): 52-59. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.02.010.

Chen, Yan, Bin Wu, Karin Musier-Forsyth, Louis M. Mansky, et Joachim D. Mueller. 2009. « Fluorescence Fluctuation Spectroscopy on Viral-Like Particles Reveals Variable Gag Stoichiometry ». *Biophysical Journal* 96 (5): 1961-69. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.10.067.

Chong, Chun Kong, Ching Yan Serene Cheng, Sin Yi Jasmine Tsoi, Fung-Yu Huang, Fen Liu, James Fung, Wai-Kay Seto, et al. 2020. « HBV X Protein Mutations Affect HBV Transcription and Association of Histone-Modifying Enzymes with Covalently Closed Circular DNA ». *Scientific Reports* 10 (1): 802. https://doi.org/10.1038/s41598-020-57637-z.

Chong, Chun Kong, Ching Yan Serene Cheng, Sin Yi Jasmine Tsoi, Fung-Yu Huang, Fen Liu, Wai-Kay Seto, Ching-Lung Lai, Man-Fung Yuen, et Danny Ka-Ho Wong. 2017. « Role of Hepatitis B Core Protein in HBV Transcription and Recruitment of Histone Acetyltransferases to CccDNA Minichromosome ». *Antiviral Research* 144 (août): 1-7. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.05.003.

Chou, Yi-ying, Nicholas S. Heaton, Qinshan Gao, Peter Palese, Robert Singer, et Timothée Lionnet. 2013. « Colocalization of Different Influenza Viral RNA Segments in the Cytoplasm before Viral Budding as Shown by Single-Molecule Sensitivity FISH Analysis ». Édité par Sean P. J. Whelan. *PLoS Pathogens* 9 (5): e1003358. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003358.

Christina Bartusch, Tatjana Döring, et Reinhild Prange. 2017. « Rab33B Controls Hepatitis B Virus Assembly by Regulating Core Membrane Association and Nucleocapsid Processing ». *Viruses* 9 (6): 157. https://doi.org/10.3390/v9060157.

Chu, Tien-Hua, An-Ting Liou, Pei-Yi Su, Huey-Nan Wu, et Chiaho Shih. 2014. « Nucleic Acid Chaperone Activity Associated with the Arginine-Rich Domain of Human Hepatitis B Virus Core Protein ». *Journal of Virology* 88 (5): 2530-43. https://doi.org/10.1128/JVI.03235-13.

Corcuera, Angelica, Katharina Stolle, Stefan Hillmer, Stefan Seitz, Ji-Young Lee, Ralf Bartenschlager, Alexander Birkmann, et Andreas Urban. 2018. « Novel Non-Heteroarylpyrimidine (HAP) Capsid Assembly Modifiers Have a Different Mode of Action from HAPs in Vitro ». *Antiviral Research* 158 (octobre): 135-42. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.07.011.

Crowther, R. 1994. « Three-Dimensional Structure of Hepatitis B Virus Core Particles Determined by Electron Cryomicroscopy ». *Cell* 77 (6): 943-50. https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90142-2.

Dane, D. S., C. H. Cameron, et Moya Briggs. 1970. « Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis ». *The lancet* 295 (7649): 695-98.

Daub, Henrik, Stephanie Blencke, Peter Habenberger, Alexander Kurtenbach, Julia Dennenmoser, Josef Wissing, Axel Ullrich, et Matt Cotten. 2002. « Identification of SRPK1 and SRPK2 as the Major Cellular Protein Kinases Phosphorylating Hepatitis B Virus Core Protein ». *Journal of Virology* 76 (16): 8124-37. https://doi.org/10.1128/JVI.76.16.8124-8137.2002.

De Clercq, Erik. 2011. « The clinical potential of the acyclic (and cyclic) nucleoside phosphonates. The magic of the phosphonate bond ». *Biochemical Pharmacology* 82 (2): 99-109. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.03.027.

Delgado, Carmen L., Elena Núñez, Belén Yélamos, Julián Gómez-Gutiérrez, Darrell L. Peterson, et Francisco Gavilanes. 2015. « Study of the Putative Fusion Regions of the PreS Domain of Hepatitis B Virus ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1848 (4): 895-906. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.12.020.

Deres, Karl, Claus H. Schröder, Arnold Paessens, Siegfried Goldmann, Hans Jörg Hacker, Olaf Weber, Thomas Krämer, et al. 2003. « Inhibition of Hepatitis B Virus Replication by Drug-Induced Depletion of Nucleocapsids ». *Science* 299 (5608): 893-96. https://doi.org/10.1126/science.1077215.

Deroubaix, Aurélie, Quentin Osseman, Aurélia Cassany, Dominique Bégu, Jessica Ragues, Somar Kassab, Sébastien Lainé, et Michael Kann. 2015. « Expression of Viral Polymerase and Phosphorylation of Core Protein Determine Core and Capsid Localization of the Human Hepatitis B Virus ». *Journal of General Virology* 96 (1): 183-95. https://doi.org/10.1099/vir.0.064816-0.

Dhason, Mary S., Joseph C.-Y. Wang, Michael F. Hagan, et Adam Zlotnick. 2012. « Differential assembly of Hepatitis B Virus core protein on single- and double-stranded nucleic acid suggest the dsDNA-filled core is spring-loaded ». *Virology* 430 (1): 20-29. https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.04.012.

Diab, Ahmed, Adrien Foca, Floriane Fusil, Thomas Lahlali, Pascal Jalaguier, Fouzia Amirache, Lia N'Guyen, et al. 2017. « Polo-like-Kinase 1 Is a Proviral Host Factor for Hepatitis B Virus Replication: Diab et Al. » *Hepatology* 66 (6): 1750-65. https://doi.org/10.1002/hep.29236.

Diogo Dias, João, Nazim Sarica, et Christine Neuveut. 2021. « Early Steps of Hepatitis B Life Cycle: From Capsid Nuclear Import to CccDNA Formation ». *Viruses* 13 (5): 757. https://doi.org/10.3390/v13050757.

Dokland, T. 1999. « Scaffolding Proteins and Their Role in Viral Assembly » 56: 24.

Döring, Tatjana, et Reinhild Prange. 2015. « Rab33B and Its Autophagic Atg5/12/16L1 Effector Assist in Hepatitis B Virus Naked Capsid Formation and Release: HBV Capsid Biogenesis Depends on Rab33B and Atg5/12/16L1 ». *Cellular Microbiology* 17 (5): 747-64. https://doi.org/10.1111/cmi.12398.

Döring, Tatjana, Lisa Zeyen, Christina Bartusch, et Reinhild Prange. 2018. « Hepatitis B Virus Subverts the Autophagy Elongation Complex Atg5-12/16L1 and Does Not Require Atg8/LC3 Lipidation for Viral Maturation ». Édité par J.-H. James Ou. *Journal of Virology* 92 (7). https://doi.org/10.1128/JVI.01513-17.

Dryden, Kelly A., Stefan F. Wieland, Christina Whitten-Bauer, John L. Gerin, Francis V. Chisari, et Mark Yeager. 2006. « Native Hepatitis B Virions and Capsids Visualized by Electron Cryomicroscopy ». *Molecular Cell* 22 (6): 843-50. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.04.025.

Eckhardt, S Gail, David R Milich, et ALAN McLachlan. 1991. « Hepatitis B Virus Core Antigen Has Two Nuclear Localization Sequences in the Arginine-Rich Carboxyl Terminust » 65: 8.

El Meshri, Salah Edin, Denis Dujardin, Julien Godet, Ludovic Richert, Christian Boudier, Jean Luc Darlix, Pascal Didier, Yves Mély, et Hugues de Rocquigny. 2015. « Role of the Nucleocapsid Domain in HIV-1 Gag Oligomerization and Trafficking to the Plasma Membrane: A Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy Investigation ». *Journal of Molecular Biology* 427 (6): 1480-94. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.01.015.

Feld, J.J., D. Colledge, V. Sozzi, R. Edwards, M. Littlejohn, et S.A. Locarnini. 2007. « The Phenylpropenamide Derivative AT-130 Blocks HBV Replication at the Level of Viral RNA Packaging ». *Antiviral Research* 76 (2): 168-77. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.06.014.

Fogarty, Keir H., Serkan Berk, Iwen F. Grigsby, Yan Chen, Louis M. Mansky, et Joachim D. Mueller. 2014. « Interrelationship between Cytoplasmic Retroviral Gag Concentration and Gag–

Membrane Association ». *Journal of Molecular Biology* 426 (7): 1611-24. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.11.025.
Fogarty, Keir H., Yan Chen, Iwen F. Grigsby, Patrick J. Macdonald, Elizabeth M. Smith, Jolene L. Johnson, Jonathan M. Rawson, Louis M. Mansky, et Joachim D. Mueller. 2011. « Characterization of Cytoplasmic Gag-Gag Interactions by Dual-Color Z-Scan Fluorescence Fluctuation Spectroscopy ». *Biophysical Journal* 100 (6): 1587-95. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.02.008.
Foglieni, Chiara, Stéphanie Papin, Agnese Salvadè, Tariq Afroz, Sandra Pinton, Giona Pedrioli, Giorgio Ulrich, Magdalini Polymenidou, et Paolo Paganetti. 2017. « Interactions of FTD-Related Proteins », 16.
Fu, Sha, Rong-rong Zhou, Ning Li, Yan Huang, et Xue-Gong Fan. 2016. « Hepatitis B Virus X Protein in Liver Tumor Microenvironment ». *Tumor Biology* 37 (12): 15371-81. https://doi.org/10.1007/s13277-016-5406-2.
Fung, J., C.-L. Lai, W.-K. Seto, et M.-F. Yuen. 2011. « Nucleoside/Nucleotide Analogues in the Treatment of Chronic Hepatitis B ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66 (12): 2715-25. https://doi.org/10.1093/jac/dkr388.
Funk, Anneke. 2007. « Avian Hepatitis B Viruses: Molecular and Cellular Biology, Phylogenesis, and Host Tropism ». *World Journal of Gastroenterology* 13 (1): 91. https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i1.91.
Garcia-Moreno, Manuel, Marko Noerenberg, Shuai Ni, Aino I. Järvelin, Esther González-Almela, Caroline E. Lenz, Marcel Bach-Pages, et al. 2019. « System-wide Profiling of RNA-Binding Proteins Uncovers Key Regulators of Virus Infection ». *Molecular Cell* 74 (1): 196-211.e11. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.01.017.
Geng, Ming. 2015. « Molecular Mechanism of Hepatitis B Virus X Protein Function in Hepatocarcinogenesis ». *World Journal of Gastroenterology* 21 (38): 10732. https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i38.10732.
Glebe, Dieter. 2007. « Viral and Cellular Determinants Involved in Hepadnaviral Entry ». *World Journal of Gastroenterology* 13 (1): 22. https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i1.22.
Gordien, Emmanuel, Olivier Rosmorduc, Cécile Peltekian, Florianne Garreau, Christian Bréchot, et Dina Kremsdorf. 2001. « Inhibition of Hepatitis B Virus Replication by the Interferon-Inducible MxA Protein ». *Journal of Virology* 75 (6): 2684-91. https://doi.org/10.1128/JVI.75.6.2684-2691.2001.
Gripon, Philippe, Sylvie Rumin, Stephan Urban, Jacques Le Seyec, Denise Glaise, Isabelle Cannie, Claire Guyomard, Josette Lucas, Christian Trepo, et Christiane Guguen-Guillouzo. 2002. « Infection of a Human Hepatoma Cell Line by Hepatitis B Virus », 6.
Guo, Fang, Qiong Zhao, Muhammad Sheraz, Junjun Cheng, Yonghe Qi, Qing Su, Andrea Cuconati, et al. 2017. « HBV Core Protein Allosteric Modulators Differentially Alter CccDNA Biosynthesis from de Novo Infection and Intracellular Amplification Pathways ». *PLOS Pathogens* 13 (9): e1006658. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006658.
Guo, Haitao, Dong Jiang, Tianlun Zhou, Andrea Cuconati, Timothy M. Block, et Ju-Tao Guo. 2007. « Characterization of the Intracellular Deproteinized Relaxed Circular DNA of Hepatitis B Virus: An Intermediate of Covalently Closed Circular DNA Formation ». *Journal of Virology* 81 (22): 12472-84. https://doi.org/10.1128/JVI.01123-07.
Hacker, Hans Jörg, Karl Deres, Maria Mildenberger, et Claus H. Schröder. 2003. « Antivirals Interacting with Hepatitis B Virus Core Protein and Core Mutations May Misdirect Capsid Assembly in a Similar Fashion ». *Biochemical Pharmacology* 66 (12): 2273-79. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2003.08.001.
Hallez, Camille, Xiongxiong Li, Rodolphe Suspène, Valérie Thiers, Mohamed S Bouzidi, Cristina M Dorobantu, Vincent Lucansky, Simon Wain-Hobson, Raphaël Gaudin, et Jean-Pierre Vartanian. 2019. « Hypoxia-Induced Human Deoxyribonuclease I Is a Cellular Restriction Factor of Hepatitis B Virus ». *Nature Microbiology* 4 (7): 1196-1207. https://doi.org/10.1038/s41564-019-0405-x.

Hantz, O., R. Parent, D. Durantel, P. Gripon, C. Guguen-Guillouzo, et F. Zoulim. 2009. « Persistence of the Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA in HepaRG Human Hepatocyte-like Cells ». *Journal of General Virology* 90 (1): 127-35. https://doi.org/10.1099/vir.0.004861-0.

Hatton, T, S Zhou, et D N Standring. 1992. « RNA- and DNA-binding activities in hepatitis B virus capsid protein: a model for their roles in viral replication. » *Journal of Virology* 66 (9): 5232-41.

Hayes, C Nelson, Yizhou Zhang, Grace Naswa Makokha, Md Zobaer Hasan, Magot D Omokoko, et Kazuaki Chayama. 2016. « Early Events in Hepatitis B Virus Infection: From the Cell Surface to the Nucleus: Early Events in HBV Entry ». *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 31 (2): 302-9. https://doi.org/10.1111/jgh.13175.

Heger-Stevic, Julia, Peter Zimmermann, Lauriane Lecoq, Bettina Böttcher, et Michael Nassal. 2018. « Hepatitis B virus core protein phosphorylation: Identification of the SRPK1 target sites and impact of their occupancy on RNA binding and capsid structure ». *PLoS Pathogens* 14 (12). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007488.

Herrscher, Charline, Florentin Pastor, Julien Burlaud-Gaillard, Amélie Dumans, Florian Seigneuret, Alain Moreau, Romuald Patient, et al. 2020. « Hepatitis B Virus Entry into HepG2-NTCP Cells Requires Clathrin-Mediated Endocytosis ». *Cellular Microbiology* n/a (n/a): e13205. https://doi.org/10.1111/cmi.13205.

Herrscher, Charline, Philippe Roingeard, et Emmanuelle Blanchard. 2020. « Hepatitis B Virus Entry into Cells ». *Cells* 9 (6): 1486. https://doi.org/10.3390/cells9061486.

Hu, J. 1997. « Hepadnavirus Assembly and Reverse Transcription Require a Multi-Component Chaperone Complex Which Is Incorporated into Nucleocapsids ». *The EMBO Journal* 16 (1): 59-68. https://doi.org/10.1093/emboj/16.1.59.

Hu, Jianming. 2009. « RNA-Protein Interactions in Hepadnavirus Reverse Transcription ». *Frontiers in Bioscience* Volume (14): 1606. https://doi.org/10.2741/3328.

Hu, Jianming, et Kuancheng Liu. 2017. « Complete and Incomplete Hepatitis B Virus Particles: Formation, Function, and Application ». *Viruses* 9 (3). https://doi.org/10.3390/v9030056.

Hu, Jianming, et Christoph Seeger. 1996. « Hsp9O Is Required for the Activity of a Hepatitis B Virus Reverse Transcriptase ». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 5.

———. 2015. « Hepadnavirus Genome Replication and Persistence ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 5 (7): a021386. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021386.

Hu, Zhanying, Haiqun Ban, Haiyan Zheng, Mingliang Liu, Jinhong Chang, et Ju-Tao Guo. 2020. « Protein Phosphatase 1 Catalyzes HBV Core Protein Dephosphorylation and Is Co-Packaged with Viral Pregenomic RNA into Nucleocapsids ». Édité par Jianming Hu. *PLOS Pathogens* 16 (7): e1008669. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008669.

Huber, Andrew D, Jennifer J Wolf, Dandan Liu, Anna T Gres, Jing Tang, Kelsey N Boschert, Maritza N Puray-Chavez, et al. 2018. « The Heteroaryldihydropyrimidine Bay 38-7690 Induces Hepatitis B Virus Core Protein Aggregates Associated with Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies in Infected Cells » 3 (2): 13.

Hurwitz, Selwyn J., Noreen McBrearty, Alla Arzumanyan, Eugene Bichenkov, Sijia Tao, Leda Bassit, Zhe Chen, et al. 2021. « Studies on the Efficacy, Potential Cardiotoxicity and Monkey Pharmacokinetics of GLP-26 as a Potent Hepatitis B Virus Capsid Assembly Modulator ». *Viruses* 13 (1): 114. https://doi.org/10.3390/v13010114.

Inoue, Jun, Eugene W. Krueger, Jing Chen, Hong Cao, Masashi Ninomiya, et Mark A. McNiven. 2015. « HBV secretion is regulated through the activation of endocytic and autophagic compartments mediated by Rab7 stimulation ». *Journal of Cell Science* 128 (9): 1696-1706. https://doi.org/10.1242/jcs.158097.

Inoue, Takako, et Yasuhito Tanaka. 2019. « The Role of Hepatitis B Core-Related Antigen ». *Genes* 10 (5): 357. https://doi.org/10.3390/genes10050357.

Iwamoto, Masashi, Wakana Saso, Kazane Nishioka, Hirofumi Ohashi, Ryuichi Sugiyama, Akihide Ryo, Mio Ohki, et al. 2020. « The Machinery for Endocytosis of Epidermal Growth Factor Receptor Coordinates the Transport of Incoming Hepatitis B Virus to the Endosomal Network ».

Journal of Biological Chemistry 295 (3): 800-807. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)49936-4.

Iwamoto, Masashi, Wakana Saso, Ryuichi Sugiyama, Koji Ishii, Mio Ohki, Shushi Nagamori, Ryosuke Suzuki, et al. 2019. « Epidermal Growth Factor Receptor Is a Host-Entry Cofactor Triggering Hepatitis B Virus Internalization ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (17): 8487-92. https://doi.org/10.1073/pnas.1811064116.

Janssen, Harry L A, Monika van Zonneveld, Hakan Senturk, Stefan Zeuzem, Ulus S Akarca, Yilmaz Cakaloglu, Christopher Simon, et al. 2005. « Pegylated Interferon Alfa-2b Alone or in Combination with Lamivudine for HBeAg-Positive Chronic Hepatitis B: A Randomised Trial » 365: 7.

Jeng, K S, C P Hu, et C M Chang. 1991. « Differential Formation of Disulfide Linkages in the Core Antigen of Extracellular and Intracellular Hepatitis B Virus Core Particles ». *Journal of Virology* 65 (7): 3924-27. https://doi.org/10.1128/jvi.65.7.3924-3927.1991.

Jeong, Jong-Keun, Gye-Soon Yoon, et Wang-Shick Ryu. 2000. « Evidence That the 5J-End Cap Structure Is Essential for Encapsidation of Hepatitis B Virus Pregenomic RNA ». *J. VIROL.* 74: 7.

Jones, S. A., R. Boregowda, T. E. Spratt, et J. Hu. 2012. « In Vitro Epsilon RNA-Dependent Protein Priming Activity of Human Hepatitis B Virus Polymerase ». *Journal of Virology* 86 (9): 5134-50. https://doi.org/10.1128/JVI.07137-11.

Jones, Scott A, et Jianming Hu. 2013. « Hepatitis B Virus Reverse Transcriptase: Diverse Functions as Classical and Emerging Targets for Antiviral Intervention ». *Emerging Microbes & Infections* 2 (9): e56-e56. https://doi.org/10.1038/emi.2013.56.

Jung, Jaesung, Seong Gyu Hwang, Yong-Joon Chwae, Sun Park, Ho-Joon Shin, et Kyongmin Kim. 2014. « Phosphoacceptors Threonine 162 and Serines 170 and 178 within the Carboxyl-Terminal RRRS/T Motif of the Hepatitis B Virus Core Protein Make Multiple Contributions to Hepatitis B Virus Replication ». *Journal of Virology* 88 (16): 8754-67. https://doi.org/10.1128/JVI.01343-14.

Junker-Niepmann, M., R. Bartenschlager, et H. Schaller. 1990. « A Short Cis-Acting Sequence Is Required for Hepatitis B Virus Pregenome Encapsidation and Sufficient for Packaging of Foreign RNA. » *The EMBO Journal* 9 (10): 3389-96. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07540.x.

Kaneko, Shun, Sei Kakinuma, Yasuhiro Asahina, Akihide Kamiya, Masato Miyoshi, Tomoyuki Tsunoda, Sayuri Nitta, et al. 2016. « Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Hepatic Cell Lines as a New Model for Host Interaction with Hepatitis B Virus ». *Scientific Reports* 6 (1): 29358. https://doi.org/10.1038/srep29358.

Kann, Michael, Beate Sodeik, Angelika Vlachou, Wolfram H. Gerlich, et Ari Helenius. 1999. « Phosphorylation-Dependent Binding of Hepatitis B Virus Core Particles to the Nuclear Pore Complex ». *Journal of Cell Biology* 145 (1): 45-55. https://doi.org/10.1083/jcb.145.1.45.

Kaplan, P M, E C Ford, R H Purcell, et J L Gerin. 1976. « Demonstration of Subpopulations of Dane Particles ». *Journal of Virology* 17 (3): 885-93. https://doi.org/10.1128/jvi.17.3.885-893.1976.

Katen, Sarah P., Srinivas Reddy Chirapu, M. G. Finn, et Adam Zlotnick. 2010. « Trapping of Hepatitis B Virus Capsid Assembly Intermediates by Phenylpropenamide Assembly Accelerators ». *ACS Chemical Biology* 5 (12): 1125-36. https://doi.org/10.1021/cb100275b.

Katen, Sarah P., Zhenning Tan, Srinivas Reddy Chirapu, MG Finn, et Adam Zlotnick. 2013. « Assembly-directed antivirals differentially bind quasi-equivalent pockets to modify HBV capsid tertiary and quaternary structure ». *Structure (London, England : 1993)* 21 (8): 1406-16. https://doi.org/10.1016/j.str.2013.06.013.

Kim, Seahee, Jehan Lee, et Wang-Shick Ryu. 2009. « Four Conserved Cysteine Residues of the Hepatitis B Virus Polymerase Are Critical for RNA Pregenome Encapsidation ». *Journal of Virology* 83 (16): 8032-40. https://doi.org/10.1128/JVI.00332-09.

Kim, Seahee, Haifeng Wang, et Wang-Shick Ryu. 2010. « Incorporation of Eukaryotic Translation Initiation Factor EIF4E into Viral Nucleocapsids via Interaction with Hepatitis B Virus Polymerase ». *Journal of Virology* 84 (1): 52-58. https://doi.org/10.1128/JVI.01232-09.

Kimura, Tatsuji, Nobuhiko Ohno, Nobuo Terada, Akinori Rokuhara, Akihiro Matsumoto, Shintaro Yagi, Eiji Tanaka, Kendo Kiyosawa, Shinichi Ohno, et Noboru Maki. 2005. « Hepatitis B Virus DNA-Negative Dane Particles Lack Core Protein but Contain a 22-KDa Precore Protein without C-Terminal Arginine-Rich Domain ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (23): 21713-19. https://doi.org/10.1074/jbc.M501564200.

King, Robert W, Stephanie K Ladner, Thomas J Miller, Katie Zaifert, Robert B Perni, Sameul C Conway, et Michael J Otto. 1998. « Inhibition of Human Hepatitis B Virus Replication by AT-61, a Phenylpropenamide Derivative, Alone and in Combination with (Χ)ᴺᴸ-L-2J,3J-Dideoxy-3J-Thiacytidine ». *ANTIMICROB. AGENTS CHEMOTHER.* 42: 8.

Klumpp, Klaus, Angela M. Lam, Christine Lukacs, Robert Vogel, Suping Ren, Christine Espiritu, Ruth Baydo, et al. 2015. « High-Resolution Crystal Structure of a Hepatitis B Virus Replication Inhibitor Bound to the Viral Core Protein ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (49): 15196-201. https://doi.org/10.1073/pnas.1513803112.

Knaus, T, et M Nassal. 1993. « The encapsidation signal on the hepatitis B virus RNA pregenome forms a stem-loop structure that is critical for its function. » *Nucleic Acids Research* 21 (17): 3967-75.

Ko, Chunkyu, Romina Bester, Xue Zhou, Zhiheng Xu, Christoph Blossey, Julia Sacherl, Florian W. R. Vondran, Lu Gao, et Ulrike Protzer. 2019. « A New Role for Capsid Assembly Modulators To Target Mature Hepatitis B Virus Capsids and Prevent Virus Infection ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 64 (1). https://doi.org/10.1128/AAC.01440-19.

Ko, Chunkyu, Anindita Chakraborty, Wen-Min Chou, Julia Hasreiter, Jochen M. Wettengel, Daniela Stadler, Romina Bester, et al. 2018. « Hepatitis B Virus Genome Recycling and de Novo Secondary Infection Events Maintain Stable CccDNA Levels ». *Journal of Hepatology* 69 (6): 1231-41. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.08.012.

König, Sabine, Gertrud Beterams, et Michael Nassal. 1998. « Mapping of Homologous Interaction Sites in the Hepatitis B Virus Core Protein ». *Journal of Virology* 72 (6): 4997-5005.

Königer, Christian, Ida Wingert, Moritz Marsmann, Christine Rösler, Jürgen Beck, et Michael Nassal. 2014. « Involvement of the Host DNA-Repair Enzyme TDP2 in Formation of the Covalently Closed Circular DNA Persistence Reservoir of Hepatitis B Viruses ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (40): E4244-53. https://doi.org/10.1073/pnas.1409986111.

Kratz, P. A., B. Bottcher, et M. Nassal. 1999. « Native Display of Complete Foreign Protein Domains on the Surface of Hepatitis B Virus Capsids ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (5): 1915-20. https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.1915.

Kwon, Sunjong. 2013. « Single-Molecule Fluorescence in Situ Hybridization: Quantitative Imaging of Single RNA Molecules ». *BMB Reports* 46 (2): 65-72. https://doi.org/10.5483/BMBRep.2013.46.2.016.

Ladner, S K, M J Otto, C S Barker, K Zaifert, G H Wang, J T Guo, C Seeger, et R W King. 1997. « Inducible Expression of Human Hepatitis B Virus (HBV) in Stably Transfected Hepatoblastoma Cells: A Novel System for Screening Potential Inhibitors of HBV Replication ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41 (8): 1715-20. https://doi.org/10.1128/AAC.41.8.1715.

Lahlali, Thomas, Jan Martin Berke, Karen Vergauwen, Adrien Foca, Koen Vandyck, Frederik Pauwels, Fabien Zoulim, et David Durantel. 2018. « Novel Potent Capsid Assembly Modulators Regulate Multiple Steps of the Hepatitis B Virus Life Cycle ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62 (10). https://doi.org/10.1128/AAC.00835-18.

Lai, Fritz, et Qingfeng Chen. 2021. « Establishment of Humanized Mice for the Study of HBV ». *Frontiers in Immunology* 12: 11.

Lam, Angela M., Suping Ren, Christine Espiritu, Mollie Kelly, Vincent Lau, Lingjie Zheng, George D. Hartman, Osvaldo A. Flores, et Klaus Klumpp. 2017. « Hepatitis B Virus Capsid Assembly Modulators, but Not Nucleoside Analogs, Inhibit the Production of Extracellular Pregenomic RNA and Spliced RNA Variants ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (8): e00680-17. https://doi.org/10.1128/AAC.00680-17.

Larson, Daniel R., Yu May Ma, Volker M. Vogt, et Watt W. Webb. 2003. « Direct Measurement of Gag–Gag Interaction during Retrovirus Assembly with FRET and Fluorescence Correlation Spectroscopy ». *Journal of Cell Biology* 162 (7): 1233-44. https://doi.org/10.1083/jcb.200303200.

Lecoq, Lauriane, Shishan Wang, Marie Dujardin, Peter Zimmermann, Leonard Schuster, Marie-Laure Fogeron, Mathilde Briday, et al. 2021. « A Pocket-Factor–Triggered Conformational Switch in the Hepatitis B Virus Capsid ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118 (17): e2022464118. https://doi.org/10.1073/pnas.2022464118.

Leistner, Corinna M., Stefanie Gruen-Bernhard, et Dieter Glebe. 2007. « Role of Glycosaminoglycans for Binding and Infection of Hepatitis B Virus ». *Cellular Microbiology* 0 (0): 070810224957001-??? https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01023.x.

Levrero, Massimo, Teresa Pollicino, Jorg Petersen, Laura Belloni, Giovanni Raimondo, et Maura Dandri. 2009. « Control of CccDNA Function in Hepatitis B Virus Infection ». *Journal of Hepatology* 51 (3): 581-92. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.05.022.

Li, Hung-Cheng, Er-Yi Huang, Pei-Yi Su, Szu-Yao Wu, Ching-Chun Yang, Young-Sun Lin, Wen-Chang Chang, et Chiaho Shih. 2010. « Nuclear Export and Import of Human Hepatitis B Virus Capsid Protein and Particles ». Édité par Jing-hsiung James Ou. *PLoS Pathogens* 6 (10): e1001162. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001162.

Li, J., Y. Liu, Z. Wang, K. Liu, Y. Wang, J. Liu, H. Ding, et Z. Yuan. 2011. « Subversion of Cellular Autophagy Machinery by Hepatitis B Virus for Viral Envelopment ». *Journal of Virology* 85 (13): 6319-33. https://doi.org/10.1128/JVI.02627-10.

Li, Yingying, et Guangxiang Luo. 2021. « Human Low-Density Lipoprotein Receptor Plays an Important Role in Hepatitis B Virus Infection ». Édité par Jianming Hu. *PLOS Pathogens* 17 (7): e1009722. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009722.

Lim, Chun Shen, et Chris M. Brown. 2016. « Hepatitis B Virus Nuclear Export Elements: RNA Stem-Loop α and β, Key Parts of the HBV Post-Transcriptional Regulatory Element ». *RNA Biology* 13 (9): 743-47. https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1166330.

Lin, Yong, Zhenyu Zhao, Ailong Huang, et Mengji Lu. 2020. « Interplay between Cellular Autophagy and Hepatitis B Virus Replication: A Systematic Review ». *Cells* 9 (9): 2101. https://doi.org/10.3390/cells9092101.

Littlejohn, Margaret, Stephen Locarnini, et Lilly Yuen. 2016. « Origins and Evolution of Hepatitis B Virus and Hepatitis D Virus ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 6 (1): a021360. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021360.

Liu, Fei, Amy C. H. Lee, Fang Guo, Andrew S. Kondratowicz, Holly M. Micolochick Steuer, Angela Miller, Lauren D. Bailey, et al. 2021. « Host Poly(A) Polymerases PAPD5 and PAPD7 Provide Two Layers of Protection That Ensure the Integrity and Stability of Hepatitis B Virus RNA ». *Journal of Virology*, juin. https://doi.org/10.1128/JVI.00574-21.

Liu, Kuancheng, et Jianming Hu. 2019. « Secretion of Empty or Complete Hepatitis B Virions: Envelopment of Empty Capsids versus Mature Nucleocapsids ». *Future Virology* 14 (2): 95-105. https://doi.org/10.2217/fvl-2018-0128.

Liu, Kuancheng, Laurie Luckenbaugh, Xiaojun Ning, Ji Xi, et Jianming Hu. 2018. « Multiple Roles of Core Protein Linker in Hepatitis B Virus Replication », 25.

Liu, Ning, Lin Ji, Megan L. Maguire, et Daniel D. Loeb. 2004. « *Cis* -Acting Sequences That Contribute to the Synthesis of Relaxed-Circular DNA of Human Hepatitis B Virus ». *Journal of Virology* 78 (2): 642-49. https://doi.org/10.1128/JVI.78.2.642-649.2004.

Lott, L., B. Beames, L. Notvall, et R. E. Lanford. 2000. « Interaction between Hepatitis B Virus Core Protein and Reverse Transcriptase ». *Journal of Virology* 74 (24): 11479-89. https://doi.org/10.1128/JVI.74.24.11479-11489.2000.

Loureiro, Dimitri, Issam Tout, Stéphanie Narguet, Sabrina Menasria Benazzouz, Abdellah Mansouri, et Tarik Asselah. 2020. « MiRNAs as Potential Biomarkers for Viral Hepatitis B and C ». *Viruses* 12 (12): 1440. https://doi.org/10.3390/v12121440.

Lucifora, Julie, Silke Arzberger, David Durantel, Laura Belloni, Michel Strubin, Massimo Levrero, Fabien Zoulim, Olivier Hantz, et Ulrike Protzer. 2011. « Hepatitis B Virus X Protein Is Essential to Initiate and Maintain Virus Replication after Infection ». *Journal of Hepatology* 55 (5): 996-1003. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.02.015.

Lucifora, Julie, Florentin Pastor, Émilie Charles, Caroline Pons, Héloïse Auclair, Floriane Fusil, Michel Rivoire, François-Loïc Cosset, David Durantel, et Anna Salvetti. 2021. « Evidence for Long-Term Association of Virion-Delivered Hepatitis B Virus Core Protein with CccDNA Independently of Viral Protein Production ». *JHEP Reports*, juillet, 100330. https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2021.100330.

Luckenbaugh, L., K. M. Kitrinos, W. E. Delaney, et J. Hu. 2015. « Genome-Free Hepatitis B Virion Levels in Patient Sera as a Potential Marker to Monitor Response to Antiviral Therapy ». *Journal of Viral Hepatitis* 22 (6): 561-70. https://doi.org/10.1111/jvh.12361.

Ludgate, L., X. Ning, D. H. Nguyen, C. Adams, L. Mentzer, et J. Hu. 2012. « Cyclin-Dependent Kinase 2 Phosphorylates S/T-P Sites in the Hepadnavirus Core Protein C-Terminal Domain and Is Incorporated into Viral Capsids ». *Journal of Virology* 86 (22): 12237-50. https://doi.org/10.1128/JVI.01218-12.

Ludgate, Kuancheng Liu, Laurie Luckenbaugh, Nicholas Streck, Stacey Eng, Christian Voitenleitner, William E. Delaney, et Jianming Hu. 2016. « Cell-Free Hepatitis B Virus Capsid Assembly Dependent on the Core Protein C-Terminal Domain and Regulated by Phosphorylation ». *Journal of Virology* 90 (12): 5830-44. https://doi.org/10.1128/JVI.00394-16.

Luo, Jun, Ji Xi, Lu Gao, et Jianming Hu. 2020. « Role of Hepatitis B Virus Capsid Phosphorylation in Nucleocapsid Disassembly and Covalently Closed Circular DNA Formation ». Édité par Aleem Siddiqui. *PLOS Pathogens* 16 (3): e1008459. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008459.

Luo, Yue, Junjun Cheng, Zhanying Hu, Haiqun Ban, Shuo Wu, Nicky Hwang, John Kulp, et al. 2021. « Identification of Hepatitis B Virus Core Protein Residues Critical for Capsid Assembly, PgRNA Encapsidation and Resistance to Capsid Assembly Modulators ». *Antiviral Research* 191 (juillet): 105080. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2021.105080.

Lupberger, Joachim. 2013. « Identification and Characterization of a Novel Bipartite Nuclear Localization Signal in the Hepatitis B Virus Polymerase ». *World Journal of Gastroenterology* 19 (44): 8000. https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i44.8000.

Machida, A, H Ohnuma, F Tsuda, A Yoshikawa, Y Hoshi, T Tanaka, S Kishimoto, Y Akahane, Y Miyakawa, et M Mayumi. 1991. « Phosphorylation in the Carboxyl-Terminal Domain of the Capsid Protein of Hepatitis B Virus: Evaluation with a Monoclonal Antibody. » *Journal of Virology* 65 (11): 6024-30. https://doi.org/10.1128/JVI.65.11.6024-6030.1991.

MacLachlan, J. H., et B. C. Cowie. 2015. « Hepatitis B Virus Epidemiology ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 5 (5): a021410-a021410. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021410.

Macovei, A., C. Petrareanu, C. Lazar, P. Florian, et N. Branza-Nichita. 2013. « Regulation of Hepatitis B Virus Infection by Rab5, Rab7, and the Endolysosomal Compartment ». *Journal of Virology* 87 (11): 6415-27. https://doi.org/10.1128/JVI.00393-13.

Mahoney, Francis J. 1999. « Update on Diagnosis, Management, and Prevention of Hepatitis B Virus Infection ». *Clinical Microbiology Reviews* 12 (2): 351-66. https://doi.org/10.1128/CMR.12.2.351.

Maldonado, José, Isaac Angert, Sheng Cao, Serkan Berk, Wei Zhang, Joachim Mueller, et Louis Mansky. 2017. « Perturbation of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Particle Morphology by Differential Gag Co-Packaging ». *Viruses* 9 (7): 191. https://doi.org/10.3390/v9070191.

Marlet, Julien, Clément Lier, Emmanuelle Roch, Morgan Maugey, Alain Moreau, Benjamin Combe, Sandrine Lefeuvre, et al. 2020. « Revisiting HBV Resistance to Entecavir with a Phenotypic Approach ». *Antiviral Research* 181 (septembre): 104869. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104869.

Maupas, P, P Coursaget, A Goudeau, et P Bagros. 1976. « IMMUNISATION AGAINST HEPATITIS B IN », 4.

Messageot, Fabienne, Samia Salhi, Patricia Eon, et Jean-Michel Rossignol. 2003. « Proteolytic Processing of the Hepatitis B Virus e Antigen Precursor ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (2): 891-95. https://doi.org/10.1074/jbc.M207634200.

Nair, Smita, Lichun Li, Samson Francis, William W Turner, Michael VanNieuwenhze, et Adam Zlotnick. 2018. « Use of a Fluorescent Analogue of a HBV Core Protein-Directed Drug To Interrogate an Antiviral Mechanism ». *Journal of the American Chemical Society* 140 (45): 15261-69. https://doi.org/10.1021/jacs.8b07988.

Nair, Smita, et Adam Zlotnick. 2021. « HBV Core Protein Is in Flux between Cytoplasmic, Nuclear, and Nucleolar Compartments ». Édité par Ralf Bartenschlager et Stephen P. Goff. *MBio* 12 (1). https://doi.org/10.1128/mBio.03514-20.

Nakabayashi, Jun. 2016. « The Intracellular Dynamics of Hepatitis B Virus (HBV) Replication with Reproduced Virion "Re-Cycling" ». *Journal of Theoretical Biology* 396 (mai): 154-62. https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2016.02.008.

Nassal, M. 1992. « The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly. » *Journal of Virology* 66 (7): 4107-16.

Nassal, Michael. 2008. « Hepatitis B Viruses: Reverse Transcription a Different Way ». *Virus Research* 134 (1-2): 235-49. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.12.024.

Nassal, Michael, et Andrea Rieger. 1993. « An Intramolecular Disulfide Bridge between Cys-7 and Cys6l Determines the Structure of the Secretory Core Gene Product (e Antigen) of Hepatitis B Virus ». *J. VIROL.*, 9.

Ning, Xiaojun, Laurie Luckenbaugh, Kuancheng Liu, Volker Bruss, Camille Sureau, et Jianming Hu. 2018. « Common and Distinct Capsid and Surface Protein Requirements for Secretion of Complete and Genome-Free Hepatitis B Virions ». Édité par J.-H. James Ou. *Journal of Virology* 92 (14). https://doi.org/10.1128/JVI.00272-18.

Ning, Xiaojun, David Nguyen, Laura Mentzer, Christina Adams, Hyunwook Lee, Robert Ashley, Susan Hafenstein, et Jianming Hu. 2011. « Secretion of Genome-Free Hepatitis B Virus – Single Strand Blocking Model for Virion Morphogenesis of Para-retrovirus ». *PLoS Pathogens* 7 (9). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002255.

Nowotny, Marcin, Sergei A. Gaidamakov, Robert J. Crouch, et Wei Yang. 2005. « Crystal Structures of RNase H Bound to an RNA/DNA Hybrid: Substrate Specificity and Metal-Dependent Catalysis ». *Cell* 121 (7): 1005-16. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.04.024.

Oess, S, et E Hildt. 2000. « Novel Cell Permeable Motif Derived from the PreS2-Domain of Hepatitis-B Virus Surface Antigens ». *Gene Therapy* 7 (9): 750-58. https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301154.

Oropeza, Claudia E., et Alan McLachlan. 2007. « Complementarity between Epsilon and Phi Sequences in Pregenomic RNA Influences Hepatitis B Virus Replication Efficiency ». *Virology* 359 (2): 371-81. https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.08.036.

Osseman, Quentin, Lara Gallucci, Shelly Au, Christian Cazenave, Elodie Berdance, Marie-Lise Blondot, Aurélia Cassany, et al. 2018. « The Chaperone Dynein LL1 Mediates Cytoplasmic Transport of Empty and Mature Hepatitis B Virus Capsids ». *Journal of Hepatology* 68 (3): 441-48. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.10.032.

Packianathan, Charles, Sarah P. Katen, Charles E. Dann, et Adam Zlotnick. 2010. « Conformational Changes in the Hepatitis B Virus Core Protein Are Consistent with a Role for Allostery in Virus Assembly ». *Journal of Virology* 84 (3): 1607-15. https://doi.org/10.1128/JVI.02033-09.

Padilla-Parra, Sergi, et Marc Tramier. 2012. « FRET Microscopy in the Living Cell: Different Approaches, Strengths and Weaknesses ». *BioEssays* 34 (5): 369-76. https://doi.org/10.1002/bies.201100086.

Pastor, Florentin, Charline Herrscher, Romuald Patient, Sebastien Eymieux, Alain Moreau, Julien Burlaud-Gaillard, Florian Seigneuret, Hugues de Rocquigny, Philippe Roingeard, et Christophe Hourioux. 2019. « Direct Interaction between the Hepatitis B Virus Core and Envelope Proteins Analyzed in a Cellular Context ». *Scientific Reports* 9 (1): 16178. https://doi.org/10.1038/s41598-019-52824-z.

Patel, Nikesh, Simon J. White, Rebecca F Thompson, Richard Bingham, Eva U. Weiß, Daniel P. Maskell, Adam Zlotnick, et al. 2017. « The HBV RNA pre-genome encodes specific motifs that mediate interactions with the viral core protein that promote nucleocapsid assembly ». *Nature microbiology* 2 (juin): 17098. https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.98.

Patient, Romuald, Christophe Hourioux, et Philippe Roingeard. 2009. « Morphogenesis of Hepatitis B Virus and Its Subviral Envelope Particles ». *Cellular Microbiology* 11 (11): 1561-70. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01363.x.

Patterson, Angela, Zhongchao Zhao, Elizabeth Waymire, Adam Zlotnick, et Brian Bothner. 2020. « Dynamics of Hepatitis B Virus Capsid Protein Dimer Regulate Assembly through an Allosteric Network ». *ACS Chemical Biology* 15 (8): 2273-80. https://doi.org/10.1021/acschembio.0c00481.

Pedelacq, Jean-Denis, et Stéphanie Cabantous. 2019. « Development and Applications of Superfolder and Split Fluorescent Protein Detection Systems in Biology ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (14): 3479. https://doi.org/10.3390/ijms20143479.

Perlman, David H., Eric A. Berg, Peter B. O'Connor, Catherine E. Costello, et Jianming Hu. 2005. « Reverse transcription-associated dephosphorylation of hepadnavirus nucleocapsids ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (25): 9020-25. https://doi.org/10.1073/pnas.0502138102.

Pol, Jonathan G., Bouchra Lekbaby, François Redelsperger, Sofieke Klamer, Yassmina Mandouri, James Ahodantin, Ivan Bieche, et al. 2015. « Alternative Splicing-regulated Protein of Hepatitis B Virus Hacks the TNF-α-stimulated Signaling Pathways and Limits the Extent of Liver Inflammation ». *The FASEB Journal* 29 (5): 1879-89. https://doi.org/10.1096/fj.14-258715.

Pol, Stanislas. 2006. « Histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite B ». *Presse Médicale (Paris, France)*. https://doi.org/35: 308-16.

Ponsel, Dirk, et Volker Bruss. 2003. « Mapping of Amino Acid Side Chains on the Surface of Hepatitis B Virus Capsids Required for Envelopment and Virion Formation ». *Journal of Virology* 77 (1): 416-22. https://doi.org/10.1128/JVI.77.1.416-422.2003.

Porterfield, J. Zachary, Mary Savari Dhason, Daniel D. Loeb, Michael Nassal, Stephen J. Stray, et Adam Zlotnick. 2010. « Full-Length Hepatitis B Virus Core Protein Packages Viral and Heterologous RNA with Similarly High Levels of Cooperativity ». *Journal of Virology* 84 (14): 7174-84. https://doi.org/10.1128/JVI.00586-10.

Prel, Anne, Vincent Caval, Régis Gayon, Philippe Ravassard, Christine Duthoit, Emmanuel Payen, Leila Maouche-Chretien, et al. 2015. « Highly Efficient in Vitro and in Vivo Delivery of Functional RNAs Using New Versatile MS2-Chimeric Retrovirus-like Particles ». *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 2: 15039. https://doi.org/10.1038/mtm.2015.39.

Purcell, Robert H. 1993. « The Discovery of the Hepatitis Viruses ». *Gastroenterology* 104 (4): 955-63. https://doi.org/10.1016/0016-5085(93)90261-A.

Qazi, Shefah, Christopher J. Schlicksup, Jonathan Rittichier, Michael S. VanNieuwenhze, et Adam Zlotnick. 2018. « An Assembly-Activating Site in the Hepatitis B Virus Capsid Protein Can Also Trigger Disassembly ». *ACS Chemical Biology* 13 (8): 2114-20. https://doi.org/10.1021/acschembio.8b00283.

Querido, Emmanuelle, et Pascal Chartrand. 2008. « Using Fluorescent Proteins to Study MRNA Trafficking in Living Cells ». In *Methods in Cell Biology*, 85:273-92. Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)85012-1.

Rabe, Birgit, Mildred Delaleau, Andreas Bischof, Michael Foss, Irina Sominskaya, Paul Pumpens, Christian Cazenave, Michel Castroviejo, et Michael Kann. 2009. « Nuclear Entry of Hepatitis B Virus Capsids Involves Disintegration to Protein Dimers followed by Nuclear Reassociation to Capsids ». *PLoS Pathogens* 5 (8). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000563.

Rabe, Birgit, Dieter Glebe, et Michael Kann. 2006. « Lipid-Mediated Introduction of Hepatitis B Virus Capsids into Nonsusceptible Cells Allows Highly Efficient Replication and Facilitates the Study of Early Infection Events ». *Journal of Virology* 80 (11): 5465-73. https://doi.org/10.1128/JVI.02303-05.

Rabe, Birgit, Angelika Vlachou, Nelly Panté, Ari Helenius, et Michael Kann. 2003. « Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (17): 9849-54. https://doi.org/10.1073/pnas.1730940100.

Raj, Arjun, Patrick van den Bogaard, Scott A Rifkin, Alexander van Oudenaarden, et Sanjay Tyagi. 2008. « Imaging individual mRNA molecules using multiple singly labeled probes ». *Nature methods* 5 (10): 877-79. https://doi.org/10.1038/nmeth.1253.

Rat, Virgile, Xavier Pinson, Florian Seigneuret, Stéphanie Durand, Charline Herrscher, Roxane Lemoine, Julien Burlaud-Gaillard, et al. 2020. « Hepatitis B Virus Core Protein Domains Essential for Viral Capsid Assembly in a Cellular Context ». *Journal of Molecular Biology*, S0022283620303235. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.04.026.

Rat, Virgile, Florian Seigneuret, Julien Burlaud-Gaillard, Roxane Lemoine, Christophe Hourioux, Fabien Zoulim, Barbara Testoni, et al. 2019. « BAY 41-4109-Mediated Aggregation of Assembled and Misassembled HBV Capsids in Cells Revealed by Electron Microscopy ». *Antiviral Research* 169: 104557. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104557.

Richert, Ludovic, Pascal Didier, Hugues de Rocquigny, et Yves Mély. 2015. « Monitoring HIV-1 Protein Oligomerization by FLIM FRET Microscopy ». In *Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Applications*, édité par Wolfgang Becker, 111:277-307. Springer Series in Chemical Physics. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14929-5_8.

Rivière, Lise, Laetitia Gerossier, Aurélie Ducroux, Sarah Dion, Qiang Deng, Marie-Louise Michel, Marie-Annick Buendia, Olivier Hantz, et Christine Neuveut. 2015. « HBx Relieves Chromatin-Mediated Transcriptional Repression of Hepatitis B Viral CccDNA Involving SETDB1 Histone Methyltransferase ». *Journal of Hepatology* 63 (5): 1093-1102. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.06.023.

Rivière, Lise, Barbara Quioc-Salomon, Guillaume Fallot, Boris Halgand, Cyrille Féray, Marie-Annick Buendia, et Christine Neuveut. 2019. « Hepatitis B Virus Replicating in Hepatocellular Carcinoma Encodes HBx Variants with Preserved Ability to Antagonize Restriction by Smc5/6 ». *Antiviral Research* 172 (décembre): 104618. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104618.

Roca Suarez, Armando Andres, Barbara Testoni, et Fabien Zoulim. 2021. « HBV 2021: New Therapeutic Strategies against an Old Foe ». *Liver International* 41 (S1): 15-23. https://doi.org/10.1111/liv.14851.

Rodriguez-Crespo, I., J. Gomez-Gutierrez, M. Nieto, D. L. Peterson, et F. Gavilanes. 1994. « Prediction of a Putative Fusion Peptide in the S Protein of Hepatitis B Virus ». *Journal of General Virology* 75 (3): 637-39. https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-3-637.

Roingeard, Philippe, Jean-Loup Romet-Lemonne, Didier Leturcq, Alain Goudeau, et Max Essex. 1990. « Hepatitis B Virus Core Antigen (HBc Ag) Accumulation in an HBV Nonproducer Clone of HepG2-Transfected Cells Is Associated with Cytopathic Effect ». *Virology* 179 (1): 113-20. https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90280-5.

Ruan, Lu, Jodi A. Hadden, et Adam Zlotnick. 2018. « Assembly Properties of Hepatitis B Virus Core Protein Mutants Correlate with Their Resistance to Assembly-Directed Antivirals ». *Journal of Virology*, août, JVI.01082-18. https://doi.org/10.1128/JVI.01082-18.

Ryu, Dong-Kyun, Byung-Yoon Ahn, et Wang-Shick Ryu. 2010. « Proximity between the Cap and 5′ ε Stem–Loop Structure Is Critical for the Suppression of PgRNA Translation by the Hepatitis B Viral Polymerase ». *Virology* 406 (1): 56-64. https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.07.005.

Saboni, Leïla. 2019. « PRÉVALENCE DES HÉPATITES CHRONIQUES C ET B ET ANTÉCÉDENTS DE DÉPISTAGE EN POPULATION GÉNÉRALE EN 2016 : CONTRIBUTION À UNE NOUVELLE STRATÉGIE DE DÉPISTAGE, BAROMÈTRE DE SANTÉ PUBLIQUE FRANCE-BAROTEST / HCV AND HBV PREVALENCE BASED ON HOME BLOOD SELF-SAMPLING BASED, AND SCREENING HISTORY IN THE GENERAL POPULATION: CONTRIBUTION TO THE NEW FRENCH SCREENING STRATEGY, 2016 BAROMETER OF SANTÉ PUBLIQUE FRANCE-BAROTEST », 9.

Santantonio, Teresa, Maria-Christina Jung, Ralf Schneider, Doris Fernholz, Michele Milella, Laura Monno, Giuseppe Pastore, Gerd R. Pape, et Hans Will. 1992. « Hepatitis B Virus Genomes That Cannot Synthesize Pre-S2 Proteins Occur Frequently and as Dominant Virus Populations in Chronic Carriers in Italy ». *Virology* 188 (2): 948-52. https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90559-8.

Schaefer, Stephan. 2007. « Hepatitis B Virus Taxonomy and Hepatitis B Virus Genotypes ». *World Journal of Gastroenterology* 13 (1): 14. https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i1.14.

Schlicksup, Christopher John, Patrick Laughlin, Steven Dunkelbarger, Joseph Che-Yen Wang, et Adam Zlotnick. 2020. « Local Stabilization of Subunit–Subunit Contacts Causes Global Destabilization of Hepatitis B Virus Capsids ». *ACS Chemical Biology* 15 (6): 1708-17. https://doi.org/10.1021/acschembio.0c00320.

Schlicksup, Christopher John, Joseph Che-Yen Wang, Samson Francis, Balasubramanian Venkatakrishnan, William W. Turner, Michael VanNieuwenhze, et Adam Zlotnick. 2018. « Hepatitis B Virus Core Protein Allosteric Modulators Can Distort and Disrupt Intact Capsids ». *ELife* 7 (janvier): e31473. https://doi.org/10.7554/eLife.31473.

Schmitz, André, Alexandra Schwarz, Michael Foss, Lixin Zhou, Birgit Rabe, Julia Hoellenriegel, Miriam Stoeber, Nelly Panté, et Michael Kann. 2010. « Nucleoporin 153 Arrests the Nuclear Import of Hepatitis B Virus Capsids in the Nuclear Basket ». Édité par John Taylor. *PLoS Pathogens* 6 (1): e1000741. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000741.

Schweitzer, Aparna, Johannes Horn, Rafael T Mikolajczyk, Gérard Krause, et Jördis J Ott. 2015. « Estimations of Worldwide Prevalence of Chronic Hepatitis B Virus Infection: A Systematic Review of Data Published between 1965 and 2013 ». *The Lancet* 386 (10003): 1546-55. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)61412-X.

Seitz, Stefan, Stephan Urban, Christoph Antoni, et Bettina Böttcher. 2007. « Cryo-electron microscopy of hepatitis B virions reveals variability in envelope capsid interactions ». *The EMBO Journal* 26 (18): 4160-67. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601841.

Sells, M. A., M. L. Chen, et G. Acs. 1987. « Production of Hepatitis B Virus Particles in Hep G2 Cells Transfected with Cloned Hepatitis B Virus DNA. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84 (4): 1005-9. https://doi.org/10.1073/pnas.84.4.1005.

Selzer, Lisa, Ravi Kant, Joseph C.-Y. Wang, Brian Bothner, et Adam Zlotnick. 2015. « Hepatitis B Virus Core Protein Phosphorylation Sites Affect Capsid Stability and Transient Exposure of the C-Terminal Domain ». *Journal of Biological Chemistry* 290 (47): 28584-93. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.678441.

Selzer, Lisa, Sarah P. Katen, et Adam Zlotnick. 2014. « The Hepatitis B Virus Core Protein Intradimer Interface Modulates Capsid Assembly and Stability ». *Biochemistry* 53 (34): 5496-5504. https://doi.org/10.1021/bi500732b.

Seo, Hyun Wook, Joon Pyung Seo, et Guhung Jung. 2018. « Heat Shock Protein 70 and Heat Shock Protein 90 Synergistically Increase Hepatitis B Viral Capsid Assembly ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 503 (4): 2892-98. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.08.065.

Sheraz, Muhammad, Junjun Cheng, Liudi Tang, Jinhong Chang, et Ju-Tao Guo. 2019. « Cellular DNA Topoisomerases Are Required for the Synthesis of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA ». Édité par J.-H. James Ou. *Journal of Virology* 93 (11). https://doi.org/10.1128/JVI.02230-18.

Shim, Hee Youn, Xiaoyuan Quan, Young-Su Yi, et Guhung Jung. 2011. « Heat Shock Protein 90 Facilitates Formation of the HBV Capsid via Interacting with the HBV Core Protein Dimers ». *Virology* 410 (1): 161-69. https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.11.005.

Shin, Youn-Chul, Sunju Park, et Wang-Shick Ryu. 2011. « A Conserved Arginine Residue in the Terminal Protein Domain of Hepatitis B Virus Polymerase Is Critical for RNA Pre-Genome Encapsidation ». *Journal of General Virology* 92 (8): 1809-16. https://doi.org/10.1099/vir.0.031914-0.

Short, Judith M., Shaoxia Chen, Alan M. Roseman, P. Jonathan G. Butler, et R. Anthony Crowther. 2009. « Structure of Hepatitis B Surface Antigen from Subviral Tubes Determined by Electron Cryomicroscopy ». *Journal of Molecular Biology* 390 (1): 135-41. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.04.059.

Somiya, Masaharu, Yasuo Sasaki, Takashi Matsuzaki, Qiushi Liu, Masumi Iijima, Nobuo Yoshimoto, Tomoaki Niimi, Andrés Daniel Maturana, et Shun'ichi Kuroda. 2015. « Intracellular Trafficking of Bio-Nanocapsule–Liposome Complex: Identification of Fusogenic Activity in the Pre-S1 Region of Hepatitis B Virus Surface Antigen L Protein ». *Journal of Controlled Release* 212 (août): 10-18. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.06.012.

Song, Hongxiao, Fengchao Xu, Qingfei Xiao, et Guangyun Tan. 2021. « Hepatitis B Virus X Protein and Its Host Partners ». *Cellular & Molecular Immunology* 18 (5): 1345-46. https://doi.org/10.1038/s41423-021-00674-z.

Soussan, Patrick, Florianne Garreau, Hervé Zylberberg, Cyrille Ferray, Christian Brechot, et Dina Kremsdorf. 2000. « In Vivo Expression of a New Hepatitis B Virus Protein Encoded by a Spliced RNA ». *Journal of Clinical Investigation* 105 (1): 55-60. https://doi.org/10.1172/JCI8098.

Soussan, Patrick, Rosella Tuveri, Bertrand Nalpas, Florianne Garreau, Flora Zavala, Annie Masson, Stanislas Pol, Christian Brechot, et Dina Kremsdorf. 2003. « The Expression of Hepatitis B Spliced Protein (HBSP) Encoded by a Spliced Hepatitis B Virus RNA Is Associated with Viral Replication and Liver Fibrosis ». *Journal of Hepatology* 38 (3): 343-48. https://doi.org/10.1016/S0168-8278(02)00422-1.

Stannard, L. M., J. Moodie, G. A. Keen, et A. Kipps. 1973. « Electron Microscopic Study of the Distribution of the Australia Antigen in Individual Sera of 50 Serologically Positive Blood Donors and Two Patients with Serum Hepatitis ». *Journal of Clinical Pathology* 26 (3): 209-16. https://doi.org/10.1136/jcp.26.3.209.

Stray, Stephen J., Christina R. Bourne, Sreenivas Punna, Warren G. Lewis, M. G. Finn, et Adam Zlotnick. 2005. « A heteroaryldihydropyrimidine activates and can misdirect hepatitis B virus capsid assembly ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (23): 8138-43.

Stray, Stephen J., et Adam Zlotnick. 2006. « BAY 41-4109 Has Multiple Effects on Hepatitis B Virus Capsid Assembly ». *Journal of Molecular Recognition* 19 (6): 542-48. https://doi.org/10.1002/jmr.801.

Su, Pei-Yi, Ching-Jen Yang, Tien-Hua Chu, Chih-Hsu Chang, Chiayn Chiang, Fan-Mei Tang, Chih-Yin Lee, et Chiaho Shih. 2016. « HBV maintains electrostatic homeostasis by modulating negative charges from phosphoserine and encapsidated nucleic acids ». *Scientific Reports* 6 (décembre). https://doi.org/10.1038/srep38959.

Sulkowski, Mark S, Kosh Agarwal, Scott Fung, Man-Fung Yuen, Xiaoli Ma, Jacob Lalezari, Tuan T Nguyen, et al. 2019. « Continued Therapy with ABI-H0731 + NrtI Results in Sequential Reduction/Loss of HBV DNA, HBV RNA, HBeAg, HBcrAg and HBsAg in HBeAg-Positive Patients », 1.

Sundquist, W. I., et H.-G. Krausslich. 2012. « HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (7): a006924-a006924. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006924.

Sureau, C, B Guerra, et H Lee. 1994. « The Middle Hepatitis B Virus Envelope Protein Is Not Necessary for Infectivity of Hepatitis Delta Virus ». *Journal of Virology* 68 (6): 4063-66. https://doi.org/10.1128/jvi.68.6.4063-4066.1994.

Sureau, Camille, et Jessica Salisse. 2013. « A Conformational Heparan Sulfate Binding Site Essential to Infectivity Overlaps with the Conserved Hepatitis B Virus A-Determinant ». *Hepatology* 57 (3): 985-94. https://doi.org/10.1002/hep.26125.

« Surveillance des hépatites B et C ». 2017, 28.

Takahashi, Kazutoshi, et Shinya Yamanaka. 2006. « Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors ». *Cell* 126 (4): 663-76. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024.

Tan, Zhenning, Megan L. Maguire, Daniel D. Loeb, et Adam Zlotnick. 2013. « Genetically Altering the Thermodynamics and Kinetics of Hepatitis B Virus Capsid Assembly Has Profound Effects on Virus Replication in Cell Culture ». *Journal of Virology* 87 (6): 3208-16. https://doi.org/10.1128/JVI.03014-12.

Teng, Yuan-Chi. 2016. « Hepatocellular Carcinoma Mouse Models: Hepatitis B Virus-Associated Hepatocarcinogenesis and Haploinsufficient Tumor Suppressor Genes ». *World Journal of Gastroenterology* 22 (1): 300. https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i1.300.

Testoni, Barbara, Fanny Lebossé, Caroline Scholtes, Françoise Berby, Clothilde Miaglia, Miroslava Subic, Alessandro Loglio, et al. 2019. « Serum Hepatitis B Core-Related Antigen (HBcrAg) Correlates with Covalently Closed Circular DNA Transcriptional Activity in Chronic Hepatitis B Patients ». *Journal of Hepatology* 70 (4): 615-25. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.11.030.

Tian, Yi, Weibing Yang, Jianxun Song, Yuzhang Wu, et Bing Ni. 2013. « Hepatitis B Virus X Protein-Induced Aberrant Epigenetic Modifications Contributing to Human Hepatocellular Carcinoma Pathogenesis ». *Molecular and Cellular Biology* 33 (15): 2810-16. https://doi.org/10.1128/MCB.00205-13.

Tramier, Marc, Morad Zahid, Jean-Claude Mevel, Marie-Jo Masse, et Maïté Coppey-Moisan. 2006. « Sensitivity of CFP/YFP and GFP/MCherry Pairs to Donor Photobleaching on FRET Determination by Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy in Living Cells ». *Microscopy Research and Technique* 69 (11): 933-39. https://doi.org/10.1002/jemt.20370.

Trepo, Christian. 2014. « A Brief History of Hepatitis Milestones ». *Liver International* 34 (s1): 29-37. https://doi.org/10.1111/liv.12409.

Tu, Thomas, Benno Zehnder, Bingqian Qu, et Stephan Urban. 2021. « De Novo Synthesis of Hepatitis B Virus Nucleocapsids Is Dispensable for the Maintenance and Transcriptional Regulation of CccDNA ». *JHEP Reports* 3 (1): 100195. https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2020.100195.

Tuttleman, Pourcel, et Summers. 1986. « Formation of the Pool of Covalently Closed Circular Viral DNA in Hepadnavirus-Infected Cells », 10. https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90602-1.

Tutucci, Evelina, Maria Vera, et Robert H. Singer. 2018. « Single-MRNA Detection in Living S. Cerevisiae Using a Re-Engineered MS2 System ». *Nature Protocols* 13 (10): 2268-96. https://doi.org/10.1038/s41596-018-0037-2.

Twu, J S, et R H Schloemer. 1987. « Transcriptional Trans-Activating Function of Hepatitis B Virus ». *Journal of Virology* 61 (11): 3448-53. https://doi.org/10.1128/jvi.61.11.3448-3453.1987.

Umetsu, Teruyuki, Jun Inoue, Takayuki Kogure, Eiji Kakazu, Masashi Ninomiya, Tomoaki Iwata, Satoshi Takai, Takuya Nakamura, Akitoshi Sano, et Tooru Shimosegawa. 2018. « Inhibitory Effect of Silibinin on Hepatitis B Virus Entry ». *Biochemistry and Biophysics Reports* 14 (juillet): 20-25. https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.03.003.

Unchwaniwala, Nuruddin, Nathan M. Sherer, et Daniel D. Loeb. 2016. « Hepatitis B Virus Polymerase Localizes to the Mitochondria, and Its Terminal Protein Domain Contains the Mitochondrial Targeting Signal ». Édité par R. M. Sandri-Goldin. *Journal of Virology* 90 (19): 8705-19. https://doi.org/10.1128/JVI.01229-16.

Urban, Stephan, Ralf Bartenschlager, Ralf Kubitz, et Fabien Zoulim. 2014. « Strategies to Inhibit Entry of HBV and HDV Into Hepatocytes ». *Gastroenterology* 147 (1): 48-64. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.04.030.

Velkov, Stoyan, Jördis Ott, Ulrike Protzer, et Thomas Michler. 2018. « The Global Hepatitis B Virus Genotype Distribution Approximated from Available Genotyping Data ». *Genes* 9 (10): 495. https://doi.org/10.3390/genes9100495.

Venkatakrishnan, Balasubramanian, et Adam Zlotnick. 2016. « The Structural Biology of Hepatitis B Virus: Form and Function ». *Annual review of virology* 3 (1): 429-51. https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042238.

Verrier, Eloi R., Che C. Colpitts, Charlotte Bach, Laura Heydmann, Amélie Weiss, Mickaël Renaud, Sarah C. Durand, et al. 2016. « A Targeted Functional RNA Interference Screen Uncovers Glypican 5 as an Entry Factor for Hepatitis B and D Viruses: VIRAL HEPATITIS ». *Hepatology* 63 (1): 35-48. https://doi.org/10.1002/hep.28013.

Viswanathan, Usha, Nagraj Mani, Zhanying Hu, Haiqun Ban, Yanming Du, Jin Hu, Jinhong Chang, et Ju-Tao Guo. 2020. « Targeting the Multifunctional HBV Core Protein as a Potential Cure for Chronic Hepatitis B ». *Antiviral Research* 182 (octobre): 104917. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104917.

Walsh, Renae, et Stephen Locarnini. 2012. « Hepatitis B Precore Protein: Pathogenic Potential and Therapeutic Promise ». *Yonsei Medical Journal* 53 (5): 875. https://doi.org/10.3349/ymj.2012.53.5.875.

Wang, Jie, Tao Shen, Xiangbo Huang, G. Renuka Kumar, Xiangmei Chen, Zhenzhen Zeng, Ruiyang Zhang, et al. 2016. « Serum Hepatitis B Virus RNA Is Encapsidated Pregenome RNA That May Be Associated with Persistence of Viral Infection and Rebound ». *Journal of Hepatology* 65 (4): 700-710. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.029.

Wang, Joseph C.-Y., Mary S. Dhason, et Adam Zlotnick. 2012. « Structural Organization of Pregenomic RNA and the Carboxy-Terminal Domain of the Capsid Protein of Hepatitis B Virus ». *PLoS Pathogens* 8 (9). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002919.

Wang, Shishan, Marie-Laure Fogeron, Maarten Schledorn, Marie Dujardin, Susanne Penzel, Dara Burdette, Jan Martin Berke, et al. 2019. « Combining Cell-Free Protein Synthesis and NMR Into a Tool to Study Capsid Assembly Modulation ». *Frontiers in Molecular Biosciences* 6 (août): 67. https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00067.

Watanabe, T., E. M. Sorensen, A. Naito, M. Schott, S. Kim, et P. Ahlquist. 2007. « Involvement of Host Cellular Multivesicular Body Functions in Hepatitis B Virus Budding ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (24): 10205-10. https://doi.org/10.1073/pnas.0704000104.

Watanabe, Tokiko, Ericka M. Sorensen, Akira Naito, Meghan Schott, Seungtaek Kim, et Paul Ahlquist. 2007. « Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (24): 10205-10. https://doi.org/10.1073/pnas.0704000104.

Watts, Norman R., James F. Conway, Naiqian Cheng, Stephen J. Stahl, David M. Belnap, Alasdair C. Steven, et Paul T. Wingfield. 2002. « The morphogenic linker peptide of HBV capsid protein forms a mobile array on the interior surface ». *The EMBO Journal* 21 (5): 876-84. https://doi.org/10.1093/emboj/21.5.876.

Wei, Lei, et Alexander Ploss. 2020. « Core Components of DNA Lagging Strand Synthesis Machinery Are Essential for Hepatitis B Virus CccDNA Formation ». *Nature Microbiology* 5 (5): 715-26. https://doi.org/10.1038/s41564-020-0678-0.

WHO. 2016. « COMBATING HEPATITIS B AND C TO REACH ELIMINATION BY 2030 ».

WHO, UNITAID. 2017. « Global hepatitis report ». http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255016/1/9789241565455-eng.pdf?ua=1.

Wi, Jimin, Mun Sik Jeong, et Hyo Jeong Hong. 2017. « Construction and Characterization of an Anti-Hepatitis B Virus PreS1 Humanized Antibody That Binds to the Essential Receptor Binding

Site ». *Journal of Microbiology and Biotechnology* 27 (7): 1336-44. https://doi.org/10.4014/jmb.1703.03066.

Wittkop, Linda, Alexandra Schwarz, Aurelia Cassany, Stefanie Grün-Bernhard, Mildred Delaleau, Birgit Rabe, Christian Cazenave, Wolfram Gerlich, Dieter Glebe, et Michael Kann. 2010. « Inhibition of Protein Kinase C Phosphorylation of Hepatitis B Virus Capsids Inhibits Virion Formation and Causes Intracellular Capsid Accumulation ». *Cellular Microbiology* 12 (7): 962-75. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01444.x.

Woo, Aaron Shu Jeng, Raymond Kwok, et Taufique Ahmed. 2017. « Alpha-Interferon Treatment in Hepatitis B ». *Annals of Translational Medicine* 5 (7): 159-159. https://doi.org/10.21037/atm.2017.03.69.

Wu, Shuo, Yue Luo, Usha Viswanathan, John Kulp, Junjun Cheng, Zhanying Hu, Qifang Xu, et al. 2018. « CpAMs Induce Assembly of HBV Capsids with Altered Electrophoresis Mobility: Implications for Mechanism of Inhibiting PgRNA Packaging ». *Antiviral Research* 159 (novembre): 1-12. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.09.001.

Wu, Shu-Xiang, Wan-Nan Chen, Zhen-Tang Jing, Wei Liu, Xin-Jian Lin, et Xu Lin. 2018. « Hepatitis B Spliced Protein (HBSP) Suppresses Fas-Mediated Hepatocyte Apoptosis via Activation of PI3K/Akt Signaling ». Édité par J.-H. James Ou. *Journal of Virology* 92 (23). https://doi.org/10.1128/JVI.01273-18.

Wynne, S.A, R.A Crowther, et A.G.W Leslie. 1999. « The Crystal Structure of the Human Hepatitis B Virus Capsid ». *Molecular Cell* 3 (6): 771-80. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)80009-5.

Yan, Huan, Guocai Zhong, Guangwei Xu, Wenhui He, Zhiyi Jing, Zhenchao Gao, Yi Huang, et al. 2012. « Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide Is a Functional Receptor for Human Hepatitis B and D Virus ». *ELife* 1 (novembre): e00049. https://doi.org/10.7554/eLife.00049.

Yeh, C T, Y F Liaw, et J H Ou. 1990. « The Arginine-Rich Domain of Hepatitis B Virus Precore and Core Proteins Contains a Signal for Nuclear Transport ». *Journal of Virology* 64 (12): 6141-47. https://doi.org/10.1128/jvi.64.12.6141-6147.1990.

Yoo, Lina, Jin-Seung Park, Koo Chul Kwon, Seong-Eun Kim, Xiong Jin, Hyunggee Kim, et Jeewon Lee. 2012. « Fluorescent Viral Nanoparticles with Stable in Vitro and in Vivo Activity ». *Biomaterials* 33 (26): 6194-6200. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.028.

Yuan, Thomas Ta-Tung, Gautam Kumar Sahu, William E. Whitehead, Richard Greenberg, et Chiaho Shih. 1999. « The Mechanism of an Immature Secretion Phenotype of a Highly Frequent Naturally Occurring Missense Mutation at Codon 97 of Human Hepatitis B Virus Core Antigen ». *Journal of Virology* 73 (7): 5731-40. https://doi.org/10.1128/JVI.73.7.5731-5740.1999.

Yue, Lei, Chang Li, Mingzhu Xu, Min Wu, Jiahui Ding, Jiangxia Liu, Xiaonan Zhang, et Zhenghong Yuan. 2021. « Probing the Spatiotemporal Patterns of HBV Multiplication Reveals Novel Features of Its Subcellular Processes ». Édité par Jianming Hu. *PLOS Pathogens* 17 (8): e1009838. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009838.

Yuen, Man Fung, Edward J. Gane, Dong Joon Kim, Frank Weilert, Henry Lik Yuen Chan, Jacob Lalezari, Seong Gyu Hwang, et al. 2019. « Antiviral Activity, Safety, and Pharmacokinetics of Capsid Assembly Modulator NVR 3-778 in Patients with Chronic HBV Infection ». *Gastroenterology* 156 (5): 1392-1403.e7. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.12.023.

Yuen, Man-Fung, Kosh Agarwal, Edward J Gane, Christian Schwabe, Sang Hoon Ahn, Dong Joon Kim, Young-Suk Lim, et al. 2020. « Safety, Pharmacokinetics, and Antiviral Effects of ABI-H0731, a Hepatitis B Virus Core Inhibitor: A Randomised, Placebo-Controlled Phase 1 Trial ». *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* 5 (2): 152-66. https://doi.org/10.1016/S2468-1253(19)30346-2.

Yuen, Man-Fung, Ding-Shinn Chen, Geoffrey M. Dusheiko, Harry L. A. Janssen, Daryl T. Y. Lau, Stephen A. Locarnini, Marion G. Peters, et Ching-Lung Lai. 2018. « Hepatitis B Virus Infection ». *Nature Reviews Disease Primers* 4 (1): 18035. https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.35.

Yuen, Man-Fung, Xue Zhou, Edward Gane, Christian Schwabe, Tawesak Tanwandee, Sheng Feng, Yuyan Jin, et al. 2021. « Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of RO7049389, a core protein allosteric modulator, in patients with chronic hepatitis B virus infection: a multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 1 trial ». *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*. https://doi.org/10.1016/S2468-1253(21)00176-X.

Zhang, Xiaonan, Lei Yue, Zhanqing Zhang, et Zhenghong Yuan. 2017. « Establishment of a fluorescent in situ hybridization assay for imaging hepatitis B virus nucleic acids in cell culture models ». *Emerging Microbes & Infections* 6 (11): e98. https://doi.org/10.1038/emi.2017.84.

Zhao, Nan, Bo Jia, Hong Zhao, Junyu Xu, Xiaoyan Sheng, Lin Luo, Zhangma Huang, et al. 2019. « A First-in-Human Trial of GLS4, a Novel Inhibitor of Hepatitis B Virus Capsid Assembly, Following Single- and Multiple-Ascending-Oral-Dose Studies with or without Ritonavir in Healthy Adult Volunteers ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 64 (1). https://doi.org/10.1128/AAC.01686-19.

Zhao, Qiong, Zhanying Hu, Junjun Cheng, Shuo Wu, Yue Luo, Jinhong Chang, Jianming Hu, et Ju-Tao Guo. 2018. « Hepatitis B Virus Core Protein Dephosphorylation Occurs during Pregenomic RNA Encapsidation ». *Journal of Virology* 92 (13). https://doi.org/10.1128/JVI.02139-17.

Zheng, Chang-Long, Yong-Mei Fu, Zhan-Xue Xu, Yong Zou, et Kai Deng. 2018. « Hepatitis B Virus Core Protein Dimer-dimer Interface Is Critical for Viral Replication ». *Molecular Medicine Reports*, novembre. https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9620.

Zhou, Zheng, Taishan Hu, Xue Zhou, Steffen Wildum, Fernando Garcia-Alcalde, Zhiheng Xu, Daitze Wu, et al. 2017. « Heteroaryldihydropyrimidine (HAP) and Sulfamoylbenzamide (SBA) Inhibit Hepatitis B Virus Replication by Different Molecular Mechanisms ». *Scientific Reports* 7 (février): 42374. https://doi.org/10.1038/srep42374.

Zlotnick, A., N. Cheng, J. F. Conway, F. P. Booy, A. C. Steven, S. J. Stahl, et P. T. Wingfield. 1996. « Dimorphism of hepatitis B virus capsids is strongly influenced by the C-terminus of the capsid protein ». *Biochemistry* 35 (23): 7412-21.

Zlotnick, Adam, Pablo Ceres, Sushmita Singh, et Jennifer M. Johnson. 2002. « A Small Molecule Inhibits and Misdirects Assembly of Hepatitis B Virus Capsids ». *Journal of Virology* 76 (10): 4848-54. https://doi.org/10.1128/JVI.76.10.4848-4854.2002.

Zlotnick, Adam, J. Zachary Porterfield, et Joseph Che-Yen Wang. 2013. « To Build a Virus on a Nucleic Acid Substrate ». *Biophysical Journal* 104 (7): 1595-1604. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.02.005.

Zlotnick, Adam, Balasubramanian Venkatakrishnan, Zhenning Tan, Eric Lewellyn, William Turner, et Samson Francis. 2015. « Core protein: A pleiotropic keystone in the HBV lifecycle ». *Antiviral Research* 121 (septembre): 82-93. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.06.020.

Zoulim, F, J Saputelli, et C Seeger. 1994. « Woodchuck Hepatitis Virus X Protein Is Required for Viral Infection in Vivo ». *Journal of Virology* 68 (3): 2026-30. https://doi.org/10.1128/jvi.68.3.2026-2030.1994.

Zoulim, Fabien, Oliver Lenz, Joris J. Vandenbossche, Willem Talloen, Thierry Verbinnen, Iurie Moscalu, Adrian Streinu-Cercel, et al. 2020. « JNJ-56136379, an HBV Capsid Assembly Modulator, Is Well-Tolerated and Has Antiviral Activity in a Phase 1 Study of Patients With Chronic Infection ». *Gastroenterology* 159 (2): 521-533.e9. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.04.036.

APPENDICE

Productions scientifiques :

Au cours de ces trois années de thèse j'ai eu l'opportunité de participer à la rédaction d'une review et de participer aux expériences d'un papier publié en plus de mes deux articles scientifiques :

-**Rat, Virgile**, Xavier Pinson, Florian Seigneuret, Stéphanie Durand, Charline Herrscher, Roxane Lemoine, Julien Burlaud-Gaillard, et al. 2020. « Hepatitis B Virus Core Protein Domains Essential for Viral Capsid Assembly in a Cellular Context ». *Journal of Molecular Biology*, mai, S0022283620303235. 10.1016/j.jmb.2020.04.026.

-**Rat, Virgile**, Florian Seigneuret, Julien Burlaud-Gaillard, Roxane Lemoine, Christophe Hourioux, Fabien Zoulim, Barbara Testoni, et al. 2019. « BAY 41-4109-Mediated Aggregation of Assembled and Misassembled HBV Capsids in Cells Revealed by Electron Microscopy ». *Antiviral Research* 169 (septembre): 10.1016/j.antiviral.2019.104557.

- Amblard, Franck, Sebastien Boucle, Leda Bassit, Bryan Cox, Ozkan Sari, Sijia Tao, Zhe Chen, Tugba Ozturk, Kiran Verma, Olivia Russell, **Virgile Rat**, Hugues de Rocquigny, Oriane Fiquet, Maud Boussand, James Di Santo, Helene-Strick-Marchand, Raymond F Schinazi. 2019. « Novel Hepatitis B Virus Capsid Assembly Modulator Induces Potent Antiviral Responses *In Vitro* and in Humanized Mice ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 64 (2): 10.1128/AAC.01701-19.

- Rocquigny, Hugues de, **Virgile Rat**, Florentin Pastor, Jean-Luc Darlix, Christophe Hourioux, et Philippe Roingeard. 2020. « Phosphorylation of the Arginine-Rich C-Terminal Domains of the Hepatitis B Virus (HBV) Core Protein as a Fine Regulator of the Interaction between HBc and Nucleic Acid ». 23. 10.3390/v12070738.

Présentation des travaux lors de congrès :

Au cours de ma thèse, j'ai pu participer à des congrès nationaux qui m'ont permis de présenter mes résultats, à la fois sous forme de posters et de communications orales :

-2019 Réunion annuelle AC42 - Réseau National Hépatites de l'ANRS. « BAY 41-4109 induces *in cellulo* aggregation and crushing of HBV capsid shells» - Paris. Communication orale.

-2020 Réunion annuelle AC42 - Réseau National Hépatites de l'ANRS. « Hepatitis B core protein domains essential for viral capsid assembly in a cellular context» - Paris. Communication orale.

-2018 Journée de la Recherche Biomédicale Angers-Tours. « Heterologous HBV capsid shells oligomerization under BAY-41-4109 molecule treatment. » - Angers.

Poster.

-2019 Journées d'Animation Scientifique de la FéRI. « Heterologous HBV capsid shells oligomerization under BAY-41-4109 molecule treatment.» - Tours.
Poster.

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY | Antimicrobial Agents and Chemotherapy®

ANTIVIRAL AGENTS

Novel Hepatitis B Virus Capsid Assembly Modulator Induces Potent Antiviral Responses *In Vitro* and in Humanized Mice

Franck Amblard,[a] Sebastien Boucle,[a] Leda Bassit,[a] Bryan Cox,[a] Ozkan Sari,[a] Sijia Tao,[a] Zhe Chen,[a] Tugba Ozturk,[a] Kiran Verma,[a] Olivia Russell,[a] Virgile Rat,[b] Hugues de Rocquigny,[b] Oriane Fiquet,[c,d] Maud Boussand,[c,d] James Di Santo,[c,d] Helene Strick-Marchand,[c,d] Raymond F. Schinazi[a]

[a]Center for AIDS Research, Laboratory of Biochemical Pharmacology, Department of Pediatrics, Emory University School of Medicine, Atlanta, Georgia, USA
[b]Morphogenèse et Antigénicité du VIH et des Virus des Hépatites, Inserm – U1259 MAVIVH, Hôpital Bretonneau, Tours, France
[c]Innate Immunity Unit, Institut Pasteur, Paris, France
[d]Inserm U1223, Paris, France

Franck Amblard and Sebastien Boucle contributed equally to this article.

ABSTRACT Hepatitis B virus (HBV) affects an estimated 250 million chronic carriers worldwide. Though several vaccines exist, they are ineffective for those already infected. HBV persists due to the formation of covalently closed circular DNA (cccDNA)—the viral minichromosome—in the nucleus of hepatocytes. Current nucleoside analogs and interferon therapies rarely clear cccDNA, requiring lifelong treatment. Our group identified GLP-26, a novel glyoxamide derivative that alters HBV nucleocapsid assembly and prevents viral DNA replication. GLP-26 exhibited single-digit nanomolar anti-HBV activity, inhibition of HBV e antigen (HBeAg) secretion, and reduced cccDNA amplification, in addition to showing a promising preclinical profile. Strikingly, long term combination treatment with entecavir in a humanized mouse model induced a decrease in viral loads and viral antigens that was sustained for up to 12 weeks after treatment cessation.

KEYWORDS capsid, hepatitis B virus, antiviral, cccDNA

Despite the availability of effective vaccines, epidemiologic data estimate that approximately 250 million people are chronically infected with hepatitis B virus (HBV) (more than the carriers of HIV and hepatitis C virus [HCV] combined) and are at high risk for development of hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma (1). Current anti-HBV treatment options include pegylated interferon alpha2a (pegIFN) and/or nucleoside analogs that require lifetime use to suppress the virus. Two key events in the HBV replication cycle involve first the generation of a covalently closed circular (cccDNA) transcriptional template, either from input viral DNA or newly replicated capsid-associated DNA, and second, reverse transcription of the viral pregenomic (pg) RNA to form HBV DNA genomes that are encapsidated into *de novo* viral particles (2, 3). HBV persists in long-lived hepatocytes due to the establishment and maintenance of cccDNA in the nucleus of host cells (4), where it is not targeted by current therapies and serves as a viral reservoir (5). Since hepatocytes have a long half-life, elimination of cccDNA by hepatocyte turnover can be considered a means of viral clearance only if the cccDNA is disrupted or silenced while replication of new HBV is stopped. HBV rebounds after cessation of treatment with currently approved nucleoside analog inhibitors. To address this issue, novel antiviral agents are now being investigated, including entry inhibitors, hepatitis B surface antigen (HBsAg) inhibitors, and capsid assembly modulators (CAM) (6).

HBV capsid assembly plays an essential role in many steps of the viral replication cycle (7). Notably, the HBV capsid is responsible for trafficking relaxed circular DNA

Citation Amblard F, Boucle S, Bassit L, Cox B, Sari O, Tao S, Chen Z, Ozturk T, Verma K, Russell O, Rat V, de Rocquigny H, Fiquet O, Boussand M, Di Santo J, Strick-Marchand H, Schinazi RF. 2020. Novel hepatitis B virus capsid assembly modulator induces potent antiviral responses *in vitro* and in humanized mice. Antimicrob Agents Chemother 64:e01701-19. https://doi.org/10.1128/AAC.01701-19.

Copyright © 2020 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Raymond F. Schinazi, rschina@emory.edu.

Received 20 August 2019
Returned for modification 9 September 2019
Accepted 23 October 2019
Accepted manuscript posted online 11 November 2019
Published 27 January 2020

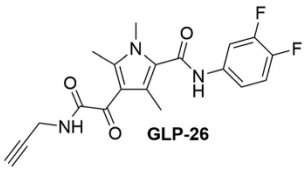


FIG 1 Structure of GLP-26.

(rcDNA) to the nucleus, thereby establishing and maintaining cccDNA levels as a "refill" mechanism. Further, the HBV capsid protein is found in the nucleus of hepatocytes and interacts with host factors responsible for transcriptional regulation (8). Therefore, it is hypothesized that targeting disruption of the nucleocapsid could impact cccDNA stability and potentially lead to eradication of HBV (9). Based on the promise of sustained antiviral activity, several CAM have been studied, such as GLS4 (1) (phase II clinical trial) (10), RG-7907 (Roche, phase I), AT-130 (2) (11), DVR-23 (12), NVR 3 to 778 (3) (13, 14) (Novira/JnJ, phase IIa), AB-423 (15) and AB-506 (16) (Arbutus), and JNJ-379 (phase IIa) (17) and ABI H0731 (18) (Assembly Bioscience, Phase 1a) (Fig. S1 in the supplemental material). Structurally these compounds are heteroaryldihydro-pyrimidines (HAPs), phenylpropenamides (PP), or sulfamoylbenzamides (SBA). Here, we report the discovery and the preclinical characterization of GLP-26, a novel CAM with a unique glyoxamidopyrrolo backbone, obtained through chemical optimization of early SBA derivatives identified by our team (19).

GLP-26 (Fig. 1) is an HBV capsid assembly modulator (CAM) displaying substantial effects at low nanomolar ranges on both HBV DNA replication and HBV e antigen (HBeAg) secretion, with greater than 1 log reduction of cccDNA amplification along with a promising preclinical profile. Most interestingly, sustained decreases in HBeAg and HBV surface antigen (HBsAg) levels were observed at up to 3 months after drug cessation in an HBV-infected humanized mouse model treated with GLP-26 in combination with entecavir.

RESULTS

GLP-26 is a nontoxic inhibitor of HBV DNA, HBeAg, and cccDNA production *in vitro*. The *in vitro* anti-HBV activity of GLP-26 was determined by measuring secreted HBV DNA from HepAD38 cells and from infected primary human hepatocytes (PHH). GLP-26 displayed potent antiviral activity, with an EC_{50} of 0.003 μM and 0.04 μM in HepAD38 cells (Table 1) and PHH (Table 2), respectively. GLP-26 did not show toxicity at up to 100 μM in human hepatoma cell lines (HepG2) nor in a panel of other relevant cell types (Table S1 in the supplemental material), yielding a wide selectivity index (SI) (HepG2 cells >33,333). It is noteworthy that GLP-26 was 25 to 120× more potent in these assays than GLS4, a CAM currently evaluated in clinical trials. In addition, GLP-26 did not show signs of mitochondrial toxicity at concentrations of up to 50 μM and no increases in lactic acid production (measured as % of lactic acid to % of nuclear DNA)

TABLE 1 Anti-HBV activity of GLP-26 in HepAD38 cells

	Anti-HBV activity[b] (μM)	
Drug[a]	EC_{50}	EC_{90}
GLP-26	0.003 ± 0.002	0.014 ± 0.002
GLS4	0.08 ± 0.02	0.28 ± 0.06
3TC	0.41 ± 0.36	1.65 ± 0.92
ETV	0.0006 ± 0.0003	0.011 ± 0.002
TDF	0.005 ± 0.0004	0.070 ± 0.010

[a]3TC, lamivudine; ETV, entecavir; TDF, tenofovir disoproxil fumarate.
[b]All values represent the average of at least two independent experiments and samples were performed in duplicate ± SD.

TABLE 2 Anti-HBV activity of GLP-26 in primary human hepatocytes (PHH)

Drug[a]	Anti-HBV activity[b] at EC_{50} (μM)	Toxicity at CC_{50} (μM)
GLP-26	0.04 ± 0.01	>10
GLS4	4.34 ± 1.62	>10
TDF	0.27 ± 0.23	>10

[a]TDF: Tenofovir disoproxil fumarate.
[b]All values represent the average of at least two independent experiments and samples were performed in duplicate ± SD.

was observed at concentrations of up to 25 μM, which is well above the $EC_{50/90}$ antiviral values (Table S2). As a correlate to cccDNA levels, GLP-26 was evaluated for inhibition of HBeAg production in HepAD38 cells (20). GLP-26 effectively inhibited HBeAg secretion with an EC_{50} of 0.003 μM, which was over 50 times more potent than GLS4 (EC_{50} of 0.16 μM, not shown). As expected, the nucleoside analog lamivudine (3TC) had a minimal effect on the inhibition of HBeAg secretion (Fig. 2A). The same system was

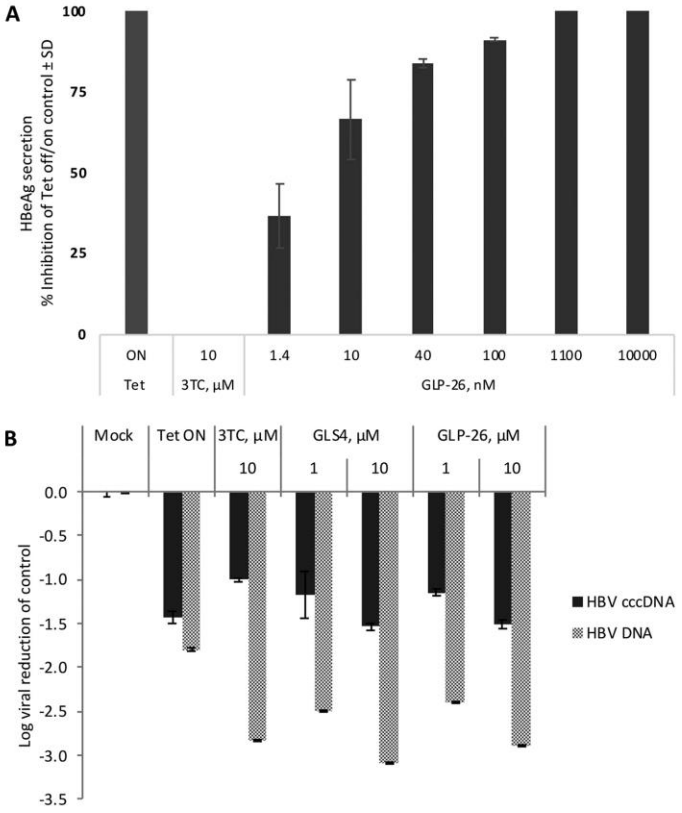


FIG 2 Decrease of cccDNA markers in HepAD38 cells by GLP-26. (A) Percent inhibition of HBeAg secretion was visualized by ELISA. Cells with or without drugs were incubated in the absence of tetracycline (Tet) for 7 days, followed by the addition of Tet to the culture of both untreated and drug-treated cells for another 7 days (from day 7 to day 14). Tet ON, cells cultured in the presence of tetracycline only for 14 days. Inhibition (%) of HBeAg secretion was determined relative to untreated Tet off/on control. (B) The levels of HBV DNA and cccDNA were quantified by qPCR and log viral reduction was determined relative to the untreated mock Tet off control. All values represent the average of at least two independent experiments and samples were performed in duplicate ± standard deviation (SD).

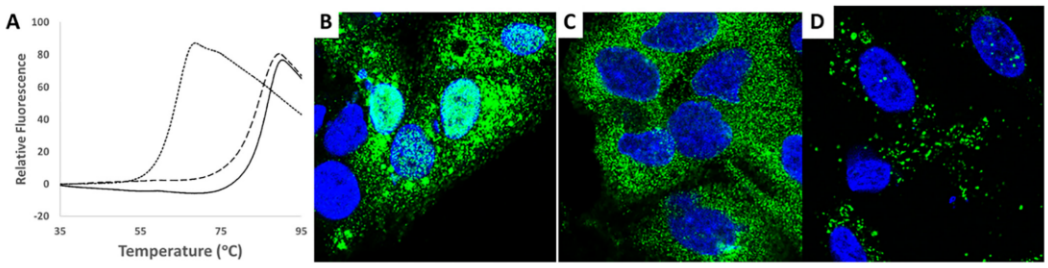


FIG 3 Effects of GLP-26 binding to HBV capsids. (A) Thermal shift fluorescence assay thermograms for vehicle (dotted line) and GLS4-treated (dashed line) and GLP-26-treated (solid line) HBV Cp149 capsids. (B to D) Confocal immunofluorescence microscopy images showing HBV core protein (green) distribution in HepAD38 hepatocytes after 24 h for vehicle (in DMSO) (B), GLP-26 (1 μM) (C), and GLS4 (1 μM) (D). Nuclei are DAPI stained (blue).

used to investigate the effects of agents on cccDNA using reverse transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR). GLP-26 and GLS4 exhibited equally potent inhibition of HBV cccDNA amplification, with a >1 log reduction relative to the untreated mock control (Fig. 2B).

GLP-26 stabilizes HBV capsid particles and induces their accumulation in the cytoplasm. Direct binding of GLP-26 to HBV capsid protein was evaluated using a fluorescent thermal shift assay by measuring changes in the thermal stability of capsids upon complexation with GLP-26 (21, 22). The HBV capsid protein fragment of 1 to 149 amino acids (aa) (Cp149) was expressed and isolated as dimers as previously described, and capsid particles were formed from Cp149 dimers by decreasing pH and increasing salt concentration. GLP-26 reproducibly increased the melting temperature of HBV Cp149 capsids (T_m = 87 ± 0.3°C) to a greater extent than did GLS4 (T_m = 85 ± 0.3°C) (Fig. 3A). Fitting the titration of GLP-26 to HBV Cp149 capsids provided a K_d (dissociation constant) of 0.7 ± 1.5 μM, which was ~60-fold lower than GLS4 (K_d = 41 ± 13 μM), indicating that GLP-26 binds to and stabilizes HBV capsids.

The effect of GLP-26 on the cellular localization of capsids was determined by confocal microscopy in HepAD38 cells (Fig. S3**)**. In the absence of either drug (Fig. 3B), 50% of the cells contained HBV core proteins corresponding to HBV capsids in both the nucleus and the cytoplasm. In contrast, treatment with GLP-26 for 24 h emptied the nucleus and led to an accumulation of capsid particles exclusively in the cytoplasm (Fig. 3C), while treatment with GLS4 caused capsids to form large aggregates spread in the cell (Fig. 3D), as previously reported for this type of HAP derivatives (23–26).

GLP-26 induces the formation of firm HBV capsid particles. The effects of GLP-26 on capsid assembly were observed using negative-stain transmission electron microscopy (TEM). To determine the effects on the assembly process, Cp149 dimers were first incubated with the drug and then followed by addition of salt to initiate assembly. In the absence of either drug, HBV capsids formed regular icosahedrons with a diameter of approximately 40 nm (Fig. 4A and B). Addition of GLP-26 to Cp149 dimers followed by assembly generated clusters of small and misshapen particles. In contrast, large, aberrant capsid morphologies were induced by GLS4 (Fig. S4). To determine the effects postassembly, images of preformed HBV capsid particles treated with compounds were collected. Addition of GLS4 to preformed capsids resulted in larger, broken assemblies, similar in appearance to cracked egg shells (Fig. S4). Unlike GLS4, fewer particles were observed upon addition of GLP-26, and those that remained exhibited smaller and firmer morphologies more like "hard boiled eggs" (Fig. 4E and F).

GLP-26 demonstrated synergistic antiviral activity with nucleoside analogs *in vitro*. Anticipating that HBV CAMs such as GLP-26 will be administered in combination with existing direct-acting agents, we evaluated its interaction with entecavir (ETV), a potent nucleoside analog inhibitor of HBV replication. For the median-effect analysis, the drugs were combined at a 5:1 ratio (GLP-26 + ETV) based on their EC_{50} values.

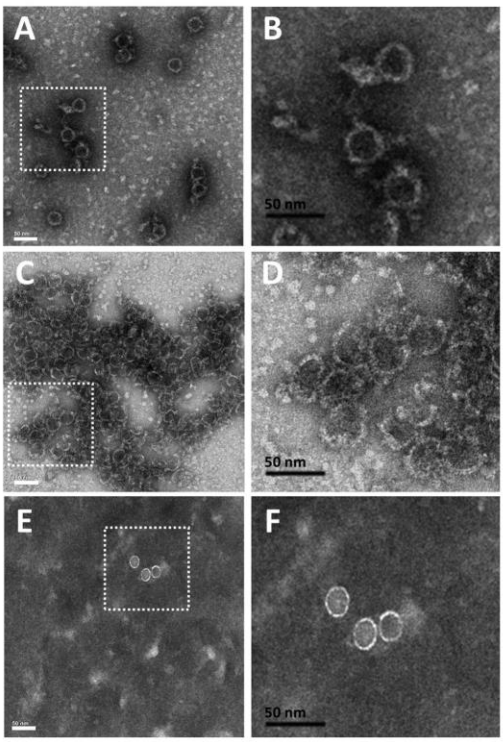


FIG 4 Effects of GLP-26 on the HBV Cp149 capsid morphology determined by negative-stain transmission electron microscopy. HBV Cp149 capsid particles were treated with vehicle (A and B) or GLP-26 (25 μM) prior to assembly initiation (C and D). For postassembly assessment, preformed HBV-Cp149 capsid particles were treated with GLP-26 (25 μM) (E and F). Black bars represent 50 nm scale.

These two agents resulted in a combination index (CI) of 0.6 (Table S3), indicating that GLP-26 interacted synergistically with ETV in the HepAD38 system.

GLP-26 has a favorable *in vitro* and *in vivo* pharmacokinetic profile. In preparation for *in vivo* applications, the stability of GLP-26 was evaluated. GLP-26 demonstrated favorable stability profiles in plasma with half-lives of >24 h in human, mouse, and dog, and a $t_{1/2}$ of ~8.5 h in rat plasma samples (Table S4). Liver microsome stability was also satisfactory, with a $t_{1/2}$ of 71 min and 7.6 h in mouse and human, respectively (Table S6).

The pharmacokinetic characteristics of GLP-26 were evaluated in CD-1 mice, where it displayed favorable oral bioavailability (Fig. S5) with an observed area under the concentration-time curve from 0 to 7 h (AUC_{0-7h}^{obs}) of 1,587 and 1,306 ng · h/ml by oral (p.o.) and intravenous (i.v.) routes, respectively. The $t_{1/2}$ was much longer from p.o. administration (>6 h) than from i.v. (1.5 h), providing prolonged concentrations well above the *in vitro* EC_{50}. Due to the favorable oral absorption profile and long half-life, we decided to deliver GLP-26 *in vivo* using oral dosing.

GLP-26 decreases HBV DNA, HBsAg, and HBeAg levels in HBV-infected humanized mice. To evaluate GLP-26 activity *in vivo*, HBV-infected BRGS-uPA mice with chimeric humanized livers (HUHEP mice) (27, 28) were treated with either GLP-26 alone (60 mg/kg/day) or in combination with ETV (0.3 mg/kg/day) by oral administration (Fig. 5A to D). At the start of treatment, all mice had serum human albumin (hAlb) levels

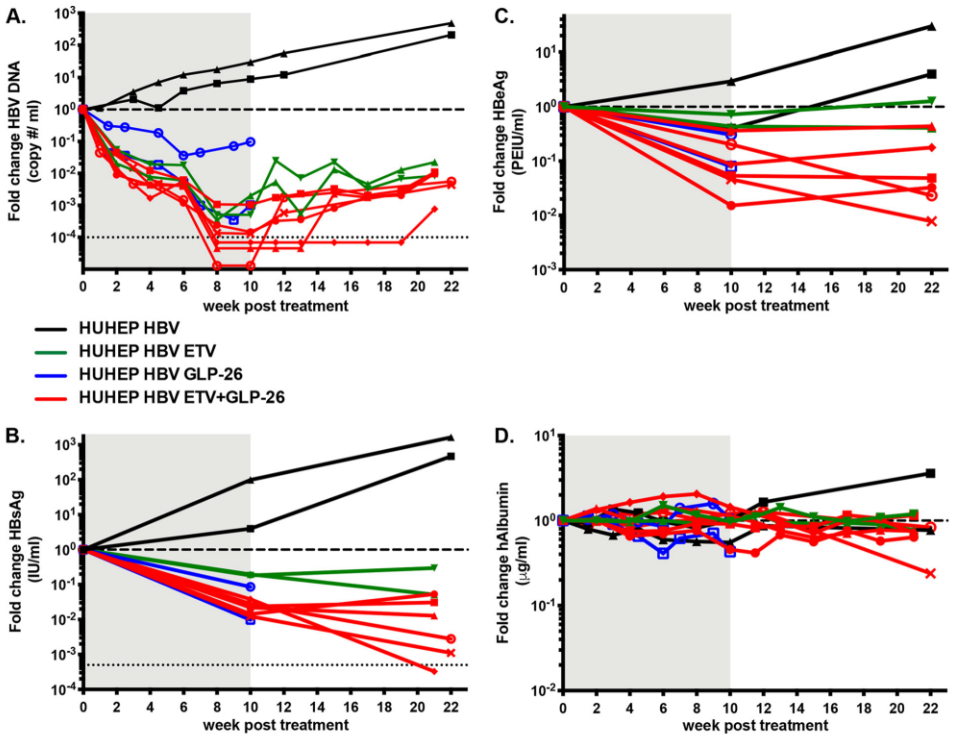


FIG 5 Sustained antiviral activity of GLP-26 in HBV-infected humanized mice by oral administration. Effect of entecavir (ETV) (0.3 mg/kg/day), GLP-26 (60 mg/kg/day) or the combination of ETV/ GLP-26 at the same doses on HBV DNA (A), HBsAg (B), HBeAg (C), and human albumin (D) in HBV-infected HUHEP mice. Treatment period is indicated in the gray shaded area followed by a rebound period. The lower limit of detection is shown as a thin dotted horizontal line in A and B. The thick dotted horizontal line shows the reference point of one for evaluating fold changes. Each full line represents the longitudinal results from an individual HBV-infected HUHEP mouse either untreated (black line), ETV-treated (green line), GLP-26-treated (blue line), or ETV/GLP-26-treated (red line).

above 100 μg/ml and serum HBV DNA levels above 10^6 copies/ml. Over a period of 10 weeks, the untreated cohort showed increased levels of HBV DNA (>1 log10) and HBsAg (0.5 to 2 log10) with no significant changes in HBeAg expression. Treatment with GLP-26 alone led to decreases in viral loads (1 to 3 log10), HBsAg (0.3 to 2 log10), and HBeAg (0.3 to 1 log10). In comparison, mice treated with ETV alone had a 2.7 to 3.3 log10 decrease in HBV DNA (one mouse had levels below limits of detection); however, the ETV-treated group showed minimal decreases in HBsAg and HBeAg (0.7 log10 and 0.2 log10, respectively).

GLP-26 and ETV act synergistically to reduce viral DNA and antigens with long-term sustained activity posttreatment in HBV-infected humanized mice. Based on our *in vitro* results showing a synergistic effect between capsid assembly modulator GLP-26 and nucleoside analog ETV, a similar combination was evaluated *in vivo*. HBV-infected mice were treated concomitantly with both agents for 10 weeks. In the six mice treated with the combination of ETV (0.3 mg/kg/day) and GLP-26 (60 mg/kg/day), viral loads strongly decreased, with a mean of −4 log10 HBV DNA, and half the mice had undetectable viremia at the end of treatment (Fig. 5A). Furthermore, all the mice had significantly decreased viral antigen loads, with means of −1.8 log10 and −1 log10 for HBsAg and HBeAg, respectively (Fig. 5B and C).

As half the mice in the ETV/GLP-26 group had viral loads below the limit of detection after 10 weeks, viral kinetics were monitored for 11 to 12 weeks after cessation of

treatment. During the rebound phase, viral loads returned rapidly in HBV-infected HUHEP mice that had received ETV alone, consistent with previous results (29). However, in the ETV/GLP-26 combination treatment group, of the three mice that had undetectable viremia, two remained aviremic for several weeks. HBV DNA was undetectable in one mouse for 5 weeks and the other for 11 weeks after cessation of treatment (Fig. 5A). Interestingly, even if HBeAg levels remained stable or slightly increased in most mice during the rebound phase, reduction of HBeAg up to −2 log10 was observed in two mice (Fig. 5C). HBsAg levels decreased substantially even after treatment cessation with the exception of two mice. One mouse showed undetectable levels of HBsAg (lower limit of detection = 0.1 IU/ml) despite being weakly viremic (Fig. 5B).

DISCUSSION

Current treatments for chronic HBV are limited to nucleoside polymerase inhibitors and/or pegylated interferon (pegIFN). These strategies rarely achieve a functional cure and thus development of novel therapeutic agents interfering with other essential steps of the viral replication cycle are needed. GLP-26 is a novel nontoxic CAM that displays low nanomolar activity against HBV in both HepAD38 cells and primary human hepatocytes (PHH). GLP-26 is highly specific for HBV and did not show activity against a panel of other viruses, including Dengue virus, West Nile virus, Chikungunya virus, Zika virus, and HIV-1 up to 30 μM (Table S6). Unlike heteroaryldihydropyrimidine derivatives (HAP) such as GLS4, GLP-26 binds to the capsid and induces formation of tight, intact particles. These biochemical outcomes are similar to those observed for the alternate class of CAMs that includes the propenamide (AT-130) and sulfamoylbenzamide (SBA, such as AB-423 or NVR-3-778) derivatives.

GLP-26 decreases cccDNA *in vitro* and decreases HBeAg (a biomarker of cccDNA) levels *in vitro* and *in vivo*. HBV maintains cccDNA levels by recycling mature relaxed circular DNA (rcDNA) to the nucleus (30). This process relies on the proper biophysical properties of the HBV capsid protein for rcDNA formation and nuclear transport. Since GLP-26 affects capsid assembly and possibly transport into the nucleus, the agent likely disrupts cccDNA maintenance within this cycle, leading to an overall reduction in cccDNA levels.

GLP-26 in combination with ETV potently decreased HBsAg and HBeAg levels in a humanized mouse model of infection, both during and, more importantly, after treatment. Previous studies have shown decreased HBV viral antigens during combination treatments (31), yet continued antiviral effects on these markers after treatment have not been yet reported for other CAMs from the same class, such as AB-423 (15) and JNJ-632 (32). The mechanisms resulting in the observed sustained response could arise from the very potent antiviral activity of GLP-26 (10 to 100 times more potent than AB-423 and JNJ-632) combined with a prolonged exposure from oral administration, leading to sustained efficacious levels of GLP-26. Since HBsAg seroconversion is more likely with low levels of HBsAg (33), these observations suggest there is potential for seroconversion when these biomarkers are decreased with GLP-26 treatment. In addition, the model used in this study did not reconstitute the mice with humanized immune systems, and we anticipate improved activity and seroconversion in immunocompetent animal models or humans upon treatment with GLP-26.

Overall, GLP-26 displayed favorable metabolic stability with high oral bioavailability. No adverse effects were observed after oral administration for up to 10 weeks, highlighting the relative safety of this compound. Optimization of the treatment period, oral dosing, and drug combinations (with ETV, pegIFN, etc.) will be essential to deliver a more pronounced and lasting antiviral effect in animal models and eventually in humans.

In conclusion, we identified GLP-26 as a highly potent and promising HBV CAM. Direct effects of GLP-26 on HBV capsid assembly were established using electron microscopy, confocal microscopy, and thermal shift assays. GLP-26 inhibited HBV DNA, HBeAg, and cccDNA amplification, and did not display any toxicity *in vitro*. Oral bioavailability in mice and stability in both plasma and liver microsomes strengthen an

already excellent preclinical profile. Combination treatment of GLP-26 with ETV in a humanized mouse model of HBV infection delivered sustained antiviral response for up to 12 weeks after treatment cessation, offering the hope that similar effects can be reached in humans with this novel CAM.

MATERIALS AND METHODS

Synthesis of compounds. Synthesis and characterization of GLP-26 is described in detail in the supplemental material. GLS4 was prepared according to the chemistry and methods previously described (34). Both compounds had a purity of >95% as determined by ^{1}H, ^{13}C, ^{19}F nuclear magnetic resonance (NMR) and high-pressure liquid chromatography (HPLC) analysis. Entecavir (ETV), lamivudine (3TC), and tenofovir disoproxil fumarate (TDF) were purchased from commercial vendors and confirmed at >95% purity using standard analytical methods such as mass spectrometry and NMR.

Cytotoxicity assays. *In vitro* cytotoxicity was determined using the CellTiter 96 nonradioactive cell proliferation colorimetric assay (MTT assay; Promega) in primary human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and in human T lymphoblast (CEM) and human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell lines. Toxicity levels were measured as the concentration of test compound that inhibited cell proliferation by 50% (50% cytotoxic concentration, CC_{50}).

HBV assay in HepAD38 cells. The HBV assay was performed in HepAD38 cells as previously described (35). Briefly, HepAD38 cells were seeded onto 96-well plates in medium containing tetracycline (Tet) and incubated for 2 days at 37°C in a humidified 5% CO_2 atmosphere. On day two, medium with Tet was removed and cells were washed with 1× phosphate-buffered saline (PBS). Antiviral drugs were prepared in medium without Tet and added in duplicate at various concentrations. After a total of 7 days incubation, total DNA was extracted using DNeasy 96 tissue kit (Qiagen), and HBV DNA was amplified by real-time PCR (20). Antiviral activity was measured by determining the average threshold cycle for the HBV DNA amplification with the compounds (alone or in combination), which was subtracted from the average cycle of the untreated-tetracycline control (ΔCT). Drugs were first tested individually for effective concentration, which inhibited 50% and 90% of HBV DNA replication (EC_{50} and EC_{90}) using the CalcuSyn software program (Biosoft, Ferguson, MO, USA).

Evaluation of HBeAg secretion. The effect of GLP-26 on the levels of cccDNA amplification was assessed using the HepAD38 cells to measure HBeAg as a cccDNA-dependent marker (36). In this system, HBV replication is controlled with tetracycline, where its presence in the medium blocks pregenomic (pg) RNA synthesis, whereas its absence allows synthesis of pgRNA and HBV DNA replication to occur. In addition, when cells are retreated with Tet, new cccDNA formation is restored and HBeAg production can be measured as a reporter for levels of intracellular cccDNA. HepAD38 cells were incubated with or without test compounds for 7 days in medium without Tet, and another 7 days in medium with Tet, in which cccDNA formation and virus production rely exclusively on restored cccDNA and not on the transgene. Supernatants were harvested at day 14, clarified by centrifugation at 2,550 × *g* for 5 min, and stored at −70°C until use. Levels of HBeAg secreted in the culture medium were measured by using an HBeAg enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (BioChain Institute Inc. Hayward, CA) according to the manufacturer's protocol. The concentration of compound that reduced levels of secreted HBeAg by 50% (EC_{50}) was determined by linear regression.

Evaluation of intracellular HBV DNA and cccDNA levels. DNA was extracted from HepAD38 cells for cccDNA detection. On day 14 of the experiments, DNA was purified from cells using a commercially available kit (plasmid miniprep kit; Qiagen) or a modified Hirt extraction (37). All samples were treated with plasmid-safe ATP-dependent DNase (PSAD) (Epicentre, Lucigen Corporation, Middleton, WI) at 37°C for 18 h, followed by incubation at 70°C for 30 min to inactivate PSAD. For HBV cccDNA amplification, we used TaqMan primers as previously shown (38) to specifically amplify cccDNA (forward primer 5′-ACTCTTGGACTCBCAGCAATG-3′; reverse primer 5′-CTTTATACGGGTCAATGTCCA-3′; and probe 5′-FAM-C TTTTTCACCTCTGCCTAATCATCTCWTGTTCA-TAMRA-3′) using the LightCycler 480 instrument (Roche).

Anti-HBV evaluation in primary human hepatocytes. Primary human hepatocytes (PHH) were seeded on collagen-coated 48-well plates at 1.4×10^5 cells/well in InVitroGro cryoplateable (CP) hepatocyte medium (BioIVT) for 3 h, and then replenished with maintenance hepatocyte incubation (HI) medium (InVitroGro HI plus Torpedo antibiotic mix; BioIVT). After 24 h, cells were incubated with HBV inoculum at multiplicity of infection (MOI) of 1,000 genome equivalents per cell in maintenance HI medium containing 4% polyethylene glycol (PEG)-8000. The HBV inoculum was removed 24 h postinfection, and the cultures were maintained in HI medium for 4 days. Infected PHH cells were then incubated with the indicated concentrations of test compounds for 7 days, when the medium with or without compound was replenished. After a total of 10 days, supernatants were harvested and HBV DNA production was quantified by qRT-PCR using the following HBV-specific primers: HBV-AD38-qF1 (5′-CC GTCT GTG CCT TCT CAT CTG-3′), HBV-AD38-qR1 (5′-AGT CCA AGA GTY CTC TTATRY AAG ACC TT-3′), and HBV-AD38-qP1 (5′-FAM-CCG TGT GCA/ZEN/CTT CGCTTC ACC TCT GC-3′ BHQ1).

Electron microscopy. Samples of HBV Cp149 dimers and capsids were prepared as previously described (19). Samples were fixed onto a charged carbon grid and stained by uranyl acetate contrast agent for 15 min. EM images were collected using a JEOL JEM-1400 electron microscope operating at 120 kV at 25,000× to 35,000× magnification (Emory University, Robert P. Apkarian electron microscopy core facility).

Thermal shift fluorescence assay. Samples were prepared containing 2 μM HBV Cp149 capsids and various concentrations of compounds (1 to 80 μM) with <1% dimethyl sulfoxide (DMSO) to a final volume of 40 μl. Sypro orange was added to each well at 2 μl of a 1:50 dilution. Each measurement was

made in triplicate across two samples. Sypro orange fluorescence was monitored continuously as temperature scanned from 45 to 95°C at a rate of 1°C/min on a Light Cycler 480 (Roche).

Confocal microscopy. Experiments were performed on HepAD38 cells. Cells were maintained in Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, France) and 1% antibiotics (penicillin/streptomycin; Gibco, France) at 37°C in 5% CO_2. HepAD38 cells were seeded for 6 h, washed, and incubated in DMEM. Next, 1% vol/vol DMSO or 100 μM GLP-26 (in 1% vol/vol DMSO) were added to this medium. After 24 h of treatment, the medium was refreshed and cells were incubated for an additional 24 h. HepAD38 cells were fixed with 4% paraformaldehyde/PBS, permeabilized with 0.2% triton/PBS, and blocked for 45 min with 0.4% bovine serum albumin (BSA). Cells were then incubated with a human anti-HBc antibody (39) and, after successive washing in PBS, with Alexa fluor 488 goat anti-human (Thermo Fisher Scientific). The last wash contained 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and cells were kept in PBS at 4°C until observation. Fluorescence confocal images were taken using a confocal microscope LEICA SP8 gSTED equipped with 63× PL APO 1.40 CS2 oil, a laser diode at 405 nm for DAPI, and an argon laser at 488 nm for Alexa 488.

Drug combinations study. Drug interactions were analyzed using CalcuSyn (Biosoft, Ferguson, MO, USA) computer software. For the median-effect analysis, the drugs were combined at a 5:1 ratio of GLP-26 to entecavir (ETV) based on their EC_{50} values. Five to six concentrations of each single drug, or in combination, were performed in at least two independent experiments (40).

Stability of GLP-26 in mouse, rat, dog, and human plasma. One milliliter of mouse, rat, dog, or human plasma containing 5 mM $MgCl_2$ was used for the stability assay. Propantheline bromide at 10 μM was used as a positive control. The reaction was started by adding 10 μl of 1 mM stock solution of GLP-26 to give a final concentration of 10 μM and incubating at 37°C. At selected times of 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, and 24 h, 100 μl aliquots were taken and the reaction was stopped by mixing with 400 μl of ice-cold acetonitrile. The samples were centrifuged and 100 μl of the supernatant was mixed with 100 μl of liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) mobile phase modifier and then subjected to LC-MS/MS analysis.

Stability in mouse and human liver microsomes. The reaction mixture was prepared in a total volume of 1.5 ml containing 5 mM $MgCl_2$, 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), 1 mg/ml mouse or human liver microsomes, and 1 μM compound. The reaction was initiated by adding 1 mM NADPH to the mixture and incubating at 37°C. At selected times of 0, 5, 15, 30, 45, 60, and 90 min, 200 μl aliquots were taken and the reaction stopped by mixing with 200 μl of 70% ice-cold methanol. The samples were centrifuged and the supernatant were subjected to LC-MS/MS analysis. Propranolol at 10 μM was used as a positive control.

Pharmacokinetic studies. GLP-26 (3 mg/ml) in PBS containing 20% DMSO and 20% PEG-400 was given by intravenous (i.v.) injection (15 mg/kg) and orally (p.o.) (30 mg/kg) to female CD-1 mice. At the given time points of 0.5 h, 2 h, 4 h, and 7 h, blood samples were collected using heparinized capillaries. Samples were centrifuged at 15,000 × *g* for 10 min. Subsequently, blood plasma was collected and frozen at −80°C until analysis using LC-MS/MS (ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 130 Å, 1.7 μm, 3 mm × 30 mm and Turbo-Ionspray Interface in the negative ion-mode on AB Sciex 5500Qtrap).

Generation of HUHEP mice, HBV infection, and treatment. BALB/c Rag2$^{-/-}$IL-2Rγc$^{-/-}$NOD.*sirpa* uPA$^{tg/tg}$ (BRGS-uPA) mice were intrasplenically injected with 7×10^5 freshly thawed human hepatocytes (BD Biosciences, Corning) to generate HUHEP mice as previously described (28). Liver chimerism of HUHEP mice was evaluated with a species-specific human albumin (hAlb) ELISA (Bethyl Laboratories) on plasma samples as previously described (28). HUHEP mice with ≥100 μg/ml hAlb were intraperitoneally infected with 1×10^7 HBV genome equivalents as previously described (27). HBV-infected mice with $>10^6$ HBV DNA copies/ml were treated *per os* with either ETV (0.3 mg/kg/day) (Baraclude, BMS), GLP-26 (60 mg/kg/day, dissolved in PEG-400) (Sigma), or the combination of ETV/GLP-26 at the same doses, delivered in MediDrop sucralose (clear H_2O) continuously for 10 weeks. For the rebound phase, mice were returned to regular drinking water. Animals were housed in isolators under pathogen-free conditions with humane care.

Virological measurements in HUHEP mice. HBV DNA was extracted from plasma and quantified by qPCR as previously described (27). HBeAg was quantified with an ELISA chemiluminescent immunoassay kit (Autobio, China) and HBsAg was quantified with the MONOLISA HBsAg Ultra kit (Bio-Rad) following the manufacturer's protocols.

Ethics approval. IACUC approval was obtained prior to initiation of these mouse studies. Experiments were approved by an institutional ethical committee at the Institut Pasteur (Paris, France) and validated by the French Ministry of Education and Research (MENESR number 02162.02).

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 1 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by NIH grants 1-R01-AI-132833 (to R.F.S.) and 5P30-AI-50409 (CFAR) (to R.F.S.), by Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les Hépatites Virales (ANRS) grants number 2016-16180 and number 2016-16365, European Commission Seventh Framework Program PATHCo (HEALTH-F3-2012-305578), the Institut Pasteur,

and Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM) (to H.S.M.), and by ANRS and INSERM (to H.D.R.).

We gratefully acknowledge the Center for Translational Science and the Animalerie Centrale of the Institut Pasteur for productive collaboration.

We also thank Pierre-Ivan Raynal and Julien Burlaud-Gaillard from the electron microscopy (EM) facility (IBiSA) of the Tours University (http://microscopies.med.univ-tours.fr) for technical support. We gratefully acknowledge Elizabeth Wright (University of Wisconsin, Madison) and Hong Yi (Emory University, Robert P. Apkarian electronmicroscopy core) for their advice and assistance with the EM studies.

REFERENCES

1. World Health Organization. 2018. Hepatitis B fact sheet. World Health Organization, Geneva, Switzerland. http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b.
2. Locarnini S, Zoulim F. 2010. Molecular genetics of HBV infection. Antivir Ther 15, Suppl 3:3–14.
3. Schadler S, Hildt E. 2009. HBV life cycle: entry and morphogenesis. Viruses 1:185–209. https://doi.org/10.3390/v1020185.
4. Block TM, Guo H, Guo JT. 2007. Molecular virology of hepatitis B virus for clinicians. Clin Liver Dis 11:685–706. https://doi.org/10.1016/j.cld.2007.08.002.
5. Cai D, Mills C, Yu W, Yan R, Aldrich CE, Saputelli JR, Mason WS, Xu X, Guo JT, Block TM, Cuconati A, Guo H. 2012. Identification of disubstituted sulfonamide compounds as specific inhibitors of hepatitis B virus covalently closed circular DNA formation. Antimicrob Agents Chemother 56:4277–4288. https://doi.org/10.1128/AAC.00473-12.
6. Kim WR. 2018. Emerging therapies toward a functional cure for hepatitis B virus infection. Gastroenterol Hepatol (N Y) 14:439–442.
7. Cole AG. 2016. Modulators of HBV capsid assembly as an approach to treating hepatitis B virus infection. Curr Opin Pharmacol 30:131–137. https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.08.004.
8. Diab A, Foca A, Zoulim F, Durantel D, Andrisani O. 2018. The diverse functions of the hepatitis B core/capsid protein (HBc) in the viral life cycle: implications for the development of HBc-targeting antivirals. Antiviral Res 149:211–220. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.11.015.
9. Boucle S, Bassit L, Ehteshami M, Schinazi RF. 2016. Toward elimination of hepatitis B virus using novel drugs, approaches, and combined modalities. Clin Liver Dis 20:737–749. https://doi.org/10.1016/j.cld.2016.07.001.
10. Wu G, Liu B, Zhang Y, Li J, Arzumanyan A, Clayton MM, Schinazi RF, Wang Z, Goldmann S, Ren Q, Zhang F, Feitelson MA. 2013. Preclinical characterization of GLS4, an inhibitor of hepatitis B virus core particle assembly. Antimicrob Agents Chemother 57:5344–5354. https://doi.org/10.1128/AAC.01091-13.
11. Katen SP, Chirapu SR, Finn MG, Zlotnick A. 2010. Trapping of hepatitis B virus capsid assembly intermediates by phenylpropenamide assembly accelerators. ACS Chem Biol 5:1125–1136. https://doi.org/10.1021/cb100275b.
12. Campagna MR, Liu F, Mao R, Mills C, Cai D, Guo F, Zhao X, Ye H, Cuconati A, Guo H, Chang J, Xu X, Block TM, Guo JT. 2013. Sulfamoylbenzamide derivatives inhibit the assembly of hepatitis B virus nucleocapsids. J Virol 87:6931–6942. https://doi.org/10.1128/JVI.00582-13.
13. Gane EJ, Schwabe C, Walker K, Flores L, Hartman GD, Klumpp K, Liaw S, Brown NA. 2014. Phase 1a safety and pharmacokinetics of NVR 3–778, a potential first-in-class HBV core inhibitor. Hepatology 60:1279A.
14. Lam AM, Espiritu C, Vogel R, Ren S, Lau V, Kelly M, Kuduk SD, Hartman GD, Flores OA, Klumpp K. 2018. Preclinical characterization of NVR 3-778, a first-in-class capsid assembly modulator against hepatitis B virus. Antimicrob Agents Chemother 63: e01734-18.
15. Mani N, Cole AG, Phelps JR, Ardzinski A, Cobarrubias KD, Cuconati A, Dorsey BD, Evangelista E, Fan K, Guo F, Guo H, Guo JT, Harasym TO, Kadhim S, Kultgen SG, Lee ACH, Li AHL, Long Q, Majeski SA, Mao R, McClintock KD, Reid SP, Rijnbrand R, Snead NM, Micolochick Steuer HM, Stever K, Tang S, Wang X, Zhao Q, Sofia MJ. 2018. Preclinical profile of AB-423, an inhibitor of hepatitis B virus pregenomic RNA encapsidation. Antimicrob Agents Chemother 62e00082-18.
16. Mani N, Li AHL, Ardzinski A, Bailey L, Phelps JR, Burns R, Chiu T, Cole AG, Cuconati A, Dorsey BD, Evangelista E, Gotchev D, Harasym TO, Jarosz A, Kadhim S, Kondratowicz A, Kultgen SG, Kwak K, Lee ACH, Majeski S, Mcclintock K, Pan J, Pasetka C, Rijnbrand R, Shapiro A, Steuer HM, Stever K, Tang S, Teng X, Wong M, Sofia MJ. 2018. Preclinical antiviral drug combination studies utilizing novel orally bioavailable investigational agents for chronic hepatitis B infection: AB-506, a next generation HBV capsid inhibitor, and AB-452, an HBV RNA destabilizer. J Hepatol 68:S17. https://doi.org/10.1016/S0168-8278(18)30252-6.
17. National Institutes of Health. 2017. An efficacy, safety, and pharmacokinetics study of JNJ-56136379 in participants with chronic hepatitis B virus infection. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03361956.
18. Yuen MF, Agarwal K, Gane G, Schwabe C, Cheng W, Sievert W, Kim DJ, Ahn SH, Lim Y-S, Visvanathan K, Ruby E, Liaw S, Colonno R, Lopatin U. 2018. Interim safety, tolerability pharmacokinetics, and antiviral activity of ABI-H0731, a novel core protein allosteric modulator, in healthy volunteers, and non-cirrhotic viremic subjects with chronic hepatitis B. J Hepatol 68:S111. https://doi.org/10.1016/S0168-8278(18)30439-2.
19. Sari O, Boucle S, Cox BD, Ozturk T, Russell O, Bassit L, Amblard F, Schinazi RF. 2017. Synthesis of sulfamoylbenzamide derivatives as HBV capsid assembly effector. Eur J Med Chem 138:407–421. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.062.
20. Pas SD, Fries E, De Man RA, Osterhaus AD, Niesters HG. 2000. Development of a quantitative real-time detection assay for hepatitis B virus DNA and comparison with two commercial assays. J Clin Microbiol 38:2897–2901.
21. Lo MC, Aulabaugh A, Jin G, Cowling R, Bard J, Malamas M, Ellestad G. 2004. Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery. Anal Biochem 332:153–159. https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.04.031.
22. Tang J, Huber AD, Pineda DL, Boschert KN, Wolf JJ, Kankanala J, Xie J, Sarafianos SG, Wang Z. 2019. 5-Aminothiophene-2, 4-dicarboxamide analogues as hepatitis B virus capsid assembly effectors. Eur J Med Chem 164:179–192.
23. Lahlali T, Berke JM, Vergauwen K, Foca A, Vandyck K, Pauwels F, Zoulim F, Durantel D. 2018. Novel potent capsid assembly modulators regulate multiple steps of the Hepatitis B virus life-cycle. Antimicrob Agents Chemother 62:e00835-18. https://doi.org/10.1128/AAC.00835-18.
24. Huber AD, Wolf JJ, Liu D, Gres AT, Tang J, Boschert KN, Puray-Chavez MN, Pineda DL, Laughlin TG, Coonrod EM, Yang Q, Ji J, Kirby KA, Wang Z, Sarafianos SG. 2018. The heteroaryldihydropyrimidine Bay 38-7690 induces hepatitis B virus core protein aggregates associated with promyelocytic leukemia nuclear bodies in infected cells. mSphere 3:e00131-18. https://doi.org/10.1128/mSphereDirect.00131-18.
25. Corcuera A, Stolle K, Hillmer S, Seitz S, Lee J-Y, Bartenschlager R, Birkmann A, Urban A. 2018. Novel non-heteroarylpyrimidine (HAP) capsid assembly modifiers have a different mode of action from HAPs in vitro. Antiviral Res 158:135–142. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.07.011.
26. Rat V, Seigneuret F, Burlaud-Gaillard J, Lemoine R, Hourioux C, Zoulim F, Testoni B, Meunier JC, Tauber C, Roingeard P, de Rocquigny H. 2019. BAY 41-4109-mediated aggregation of assembled and misassembled HBV capsids in cells revealed by electron microscopy. Antiviral Res 169:104557. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104557.
27. Dusséaux M, Masse-Ranson G, Darche S, Ahodantin J, Li Y, Fiquet O, Beaumont E, Moreau P, Rivière L, Neuveut C, Soussan P, Roingeard P, Kremsdorf D, Di Santo JP, Strick-Marchand H. 2017. Viral load affects the immune response to HBV in mice with humanized immune system and liver. Gastroenterology 153:1647–1661. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.08.034.
28. Strick-Marchand H, Dusséaux M, Darche S, Huntington ND, Legrand N, Masse-Ranson G, Corcuff E, Ahodantin J, Weijer K, Spits H, Kremsdorf D, Di Santo JP. 2015. A novel mouse model for stable engraftment of a human immune system and human hepatocytes. PLoS One 10:e0119820. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119820.

29. Mueller H, Wildum S, Luangsay S, Walther J, Lopez A, Tropberger P, Ottaviani G, Lu W, Parrott NJ, Zhang JD, Schmucki R, Racek T, Hoflack JC, Kueng E, Point F, Zhou X, Steiner G, Lütgehetmann M, Rapp G, Volz T, Dandri M, Yang S, Young JAT, Javanbakht H. 2018. A novel orally available small molecule that inhibits hepatitis B virus expression. J Hepatol 68:412–420. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.10.014.
30. Zlotnick A, Venkatakrishnan B, Tan Z, Lewellyn E, Turner W, Francis S. 2015. Core protein: a pleiotropic keystone in the HBV lifecycle. Antiviral Res 121:82–93. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.06.020.
31. Klumpp K, Shimada T, Allweiss L, Volz T, Lütgehetmann M, Hartman G, Flores OA, Lam AM, Dandri M. 2018. Efficacy of NVR 3–778, alone and in combination with pegylated interferon, vs entecavir in uPA/SCID mice with humanized livers and HBV infection. Gastroenterology 154:652–662. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.10.017.
32. Vandyck K, Rombouts G, Stoops B, Tahri A, Vos A, Verschueren W, Wu Y, Yang J, Hou F, Huang B, Vergauwen K, Dehertogh P, Berke JM, Raboisson P. 2018. Synthesis and evaluation of N-phenyl-3-sulfamoylbenzamide derivatives as capsid assembly modulators inhibiting hepatitis B virus (HBV). J Med Chem 61:6247–6260. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00654.
33. Tseng TC, Liu CJ, Su TH, Wang CC, Chen CL, Chen PJ, Chen DS, Kao JH. 2011. Serum hepatitis B surface antigen levels predict surface antigen loss in hepatitis B e antigen seroconverters. Gastroenterology 141:517–525. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.04.046.
34. Ren Q, Liu X, Luo Z, Li J, Wang C, Goldmann S, Zhang J, Zhang Y. 2017. Discovery of hepatitis B virus capsid assembly inhibitors leading to a heteroaryldihydropyrimidine based clinical candidate (GLS4). Bioorg Med Chem 25:1042–1056. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.12.017.
35. Ladner SK, Otto MJ, Barker CS, Zaifert K, Wang GH, Guo JT, Seeger C, King RW. 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. https://doi.org/10.1128/AAC.41.8.1715.
36. Zhou T, Guo H, Guo JT, Cuconati A, Mehta A, Block TM. 2006. Hepatitis B virus e antigen production is dependent upon covalently closed circular (ccc) DNA in HepAD38 cell cultures and may serve as a cccDNA surrogate in antiviral screening assays. Antiviral Res 72:116–124. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.05.006.
37. Guo H, Jiang D, Zhou T, Cuconati A, Block TM, Guo JT. 2007. Characterization of the intracellular deproteinized relaxed circular DNA of hepatitis B virus: an intermediate of covalently closed circular DNA formation. J Virol 81:12472–12484. https://doi.org/10.1128/JVI.01123-07.
38. Chen Y, Sze J, He ML. 2004. HBV cccDNA in patients' sera as an indicator for HBV reactivation and an early signal of liver damage. World J Gastroenterol 10:82–85. https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i1.82.
39. Roingeard P, Romet-Lemonne JL, Leturcq D, Goudeau A, Essex M. 1990. Hepatitis B virus core antigen (HBc Ag) accumulation in an HBV nonproducer clone of HepG2-transfected cells is associated with cytopathic effect. Virology 179:113–120. https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90280-5.
40. Bassit L, Grier J, Bennett M, Schinazi RF. 2008. Combinations of 2′-C-methylcytidine analogues with interferon-alpha2b and triple combination with ribavirin in the hepatitis C virus replicon system. Antivir Chem Chemother 19:25–31. https://doi.org/10.1177/095632020801900104.

viruses

MDPI

Review

Phosphorylation of the Arginine-Rich C-Terminal Domains of the Hepatitis B Virus (HBV) Core Protein as a Fine Regulator of the Interaction between HBc and Nucleic Acid

Hugues de Rocquigny [1,*], Virgile Rat [1], Florentin Pastor [1], Jean Luc Darlix [2], Christophe Hourioux [1,3] and Philippe Roingeard [1,3]

1 Morphogenèse et Antigénicité du VIH et des Virus des Hépatites, Inserm–U1259 MAVIVH, Hôpital Bretonneau, 10 boulevard Tonnellé-BP 3223, CEDEX 1, 37032 Tours, France; virgile.rat@etu.univ-tours.fr (V.R.); florentin.pastor@etu.univ-tours.fr (F.P.); christophe.hourioux@univ-tours.fr (C.H.); philippe.roingeard@univ-tours.fr (P.R.)

2 Laboratory of Bioimaging and Pathologies (LBP), UMR 7021, Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg, 67400 Illkirch, France; jldarlix@gmail.com

3 Plate-Forme IBiSA des Microscopies, PPF ASB, Université de Tours and CHRU de Tours, 10 boulevard Tonnellé-BP 3223, CEDEX 1, 37032 Tours, France

* Correspondence: hderocquigny@univ-tours.fr; Tel.: +33-(2)-4736-6093; Fax: +33-(2)-4736-6126

Received: 19 May 2020; Accepted: 3 July 2020; Published: 8 July 2020



Abstract: The morphogenesis of Hepatitis B Virus (HBV) viral particles is nucleated by the oligomerization of HBc protein molecules, resulting in the formation of an icosahedral capsid shell containing the replication-competent nucleoprotein complex made of the viral polymerase and the pre-genomic RNA (pgRNA). HBc is a phospho-protein containing two distinct domains acting together throughout the viral replication cycle. The N-terminal domain, (residues 1–140), shown to self-assemble, is linked by a short flexible domain to the basic C-terminal domain (residues 150–183) that interacts with nucleic acids (NAs). In addition, the C-terminal domain contains a series of phospho-acceptor residues that undergo partial phosphorylation and de-phosphorylation during virus replication. This highly dynamic process governs the homeostatic charge that is essential for capsid stability, pgRNA packaging and to expose the C-terminal domain at the surface of the particles for cell trafficking. In this review, we discuss the roles of the N-terminal and C-terminal domains of HBc protein during HBV morphogenesis, focusing on how the C-terminal domain phosphorylation dynamics regulate its interaction with nucleic acids throughout the assembly and maturation of HBV particles.

Keywords: HBV; HBc; phosphorylation; packaging; RNA; assembly; chaperone activity

1. Introduction

Although a potent HBV (Hepatitis B Virus) vaccine is available, about 300 million people experience HBV infection, causing ~900,000 annual deaths due to liver-associated diseases, such as cirrhosis and hepatocellular carcinoma [1]. Antiviral treatments, including interferon and nucleoside/nucleotide analogues, are well tolerated, rarely leading to drug resistance. However, while these antiviral drugs suppress HBV replication, they do not cure viral infection due to the persistence of its genome in the nucleus of infected hepatocytes [2].

HBV is a hepadnavirus that packages its genome in the form of RNA, referred to as pre-genomic RNA (pgRNA) [3]. The ε stem-loop of pgRNA tightly interacts with the viral polymerase (Pol) formed

by three domains, including the terminal protein (TP) linked by a spacer to the reverse transcriptase and the RNAse H domain [4]. Thus, Pol combines the properties of a reverse transcriptase (RT) and a DNA polymerase, allowing the conversion of pgRNA into relaxed circular (rc) DNA present in the interior of the infectious particle. The HBV infectious particles, named the Dane particles, consist of an envelope made of host lipids and three surface viral proteins (L, M and S) that are essential to promote the clathrin-mediated endocytosis of the virus through the sodium taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) pathway [5–7]. This envelope wraps a 30-nm diameter icosahedral capsid formed by the core protein (HBc) and ensures the protection of the 3.2 kb partially double-stranded relaxed circular (rc) DNA genome associated with the viral DNA polymerase [8]. Moreover, viral particle production upon the DNA transfection of hepatocellular carcinoma cells, from HepAD38 or HepG2.2.15 constitutively expressing the virus or from the serum of an infected patient reveals that most of the secreted particles are subviral particles devoid of any genome (Figure 1) [9,10] (for a recent review, see [11]). These particles correspond to self-assembled envelope proteins that are spheres or filaments [12,13]; these particles act as decoys for the immune system and are potent immunogens used for vaccine development [14]. The existence of other types of viral-like particles (VLPs) was shown to correspond to genome-free enveloped capsids or to RNA-containing capsids [15]. Note that genotype G was shown to produce HBsAg but failed to secrete subviral particles that are retained as aggregates in the cytoplasm [16].

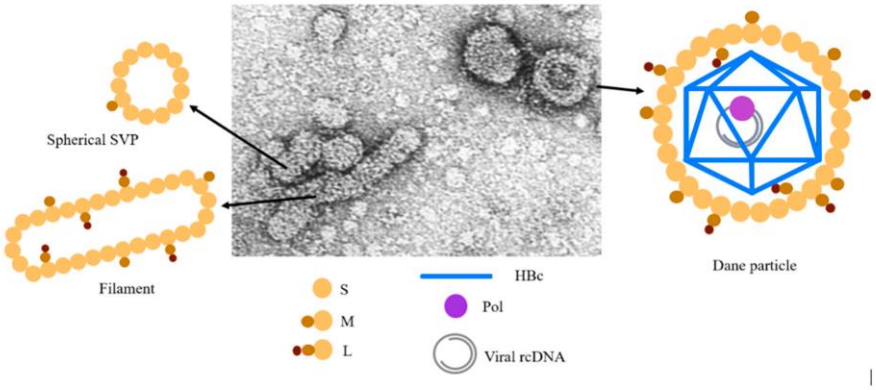


Figure 1. Schematic representation of HBV virions. Spherical and filamentous particles (SVPs) correspond to small (20 nm) entities only composed of the envelope proteins [13]. They are empty, not infectious and represent the most abundant particles found in the supernatant milieu of infected cells or in the sera of chronically infected subjects. Infectious particles (Dane particles) are larger, 42 nm in diameter, and are formed by an icosahedral capsid embedded in a lipid membrane containing the S, L and M surface proteins [10]. The internal nucleocapsid contains the circular partially double-stranded genomic DNA (rcDNA), about 3.2 kb in length, which is covalently linked to the viral reverse transcriptase. More recently, a large quantity of empty virions corresponding to enveloped capsid without rcDNA were found in cell supernatant or patient serum [11].

The pgRNA is also a messenger RNA that is translated in HBeAg, HBcAg (HBc) and Pol. HBeAg (also referred to as precore protein) is a secreted protein that contains 29 residues upstream of the HBc sequence (Figure 2) thought to modulate the host immune response [17]. The HBc protein of the 183–185 residues is schematically divided into two domains (Figure 2), where the N-terminal domain (NTD; residues 1–140) is known to self-assemble in the capsid, linked by a flexible linker to the basic C-terminal domain (CTD; residues 150–183) that interacts with nucleic acids (NAs) [18]. This protein belongs to a large family of viral core proteins that are small and multifunctional. In addition to its structural

role in the formation of capsid shells, HBc orchestrates the assembly of the viral particles through the recruitment of host and viral partners that are required for virus replication. HBc also interacts with NAs to ensure the protection of the viral genome and chaperone its replication, together with the viral polymerase. All these functions make this protein a target for the development of molecules endowed with anti-viral activities [19,20]. In this review, we will briefly summarize the role of the NTD in capsid formation and then focus on the role of the CTD at various steps of the viral cycle, notably how its phosphorylation regulates its interaction with nucleic acids. The importance of the CTD at other steps of virus replication, notably cell trafficking, genome release in the nucleus and HBV secretion, have recently been the subject of pertinent reviews [21,22].

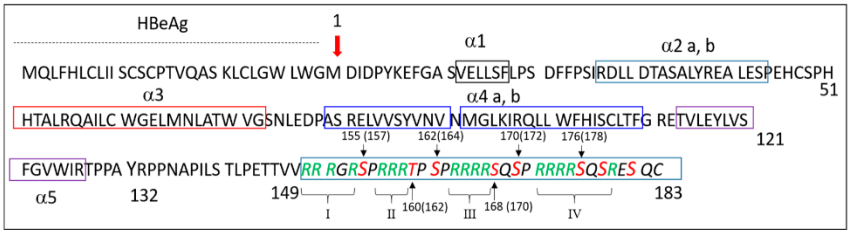


Figure 2. HBc primary sequence. HBc sequence starts at position M1. The upstream 29 residue sequence corresponds to a peptide signal that drives the translocation of the 25 kDa precore protein into the ER lumen, leading to the synthesis of a secreted form of the core protein, named HBeAg [23]. The N-terminal domain (NTD) corresponds to residues 1–140. Rectangles delineate the five alpha-helices of NTD found in NTD monomers that are essential for HBc to assemble in the icosahedral capsid [24]. The next ten residues contain the PPXA sequence found in various viral proteins to hijack the Endosomal sorting complexes required for transport machinery (ESCRT) [25,26]. This flexible sequence was recently confirmed to be essential during HBV replication. The C-terminal domain (CTD) contains arginine residues (in green) required for the interaction of HBc with nucleic acids (NAs), an activity that is regulated by the phosphorylation of the seven serine/threonine residues (in red), even though S 155, 162 and 170 are considered as the three major phosphorylation sites (residue numbers of S or T in brackets, genotype A).

2. The NTD Is Essential for Capsid Formation and Envelope Protein Recruitment

The structure of the NTD capsid has been solved by X-ray crystallography and cryo-electron microscopy, revealing the structures of monomers and dimers. Each monomer contains a series of five α helices (Figure 3). α1, 2 and 5 form a hydrophobic core that stabilizes the monomer structure, while amphipathic α3 and 4 participate in the dimer formation via a four-helix bundle, giving rise to the characteristic spikes on the surface of the capsid [24,27,28]. The interaction between dimers in the capsid involves residues of helix 5, in addition to the downstream proline-rich loop (residues 128–136) and the C-terminal arm (aa 137–142/3) [24,29,30]. This association between two dimers results in the formation of a large hydrophobic pocket where the Y132 residue is fully buried [24].

NTD alone can undergo self-assembly, forming a shell with two different icosahedral symmetries, namely T = 3 (minor assembly product 5%) or T = 4 (major assembly product 95%) (Figure 4) [31]. T = 4 means that the capsid is composed of 60 asymmetric units each made of two dimers of proteins (A–B and C–D), for a total of 240 capsid proteins per particle (Figure 4A–C). In the capsid formed of 240 monomers (T = 4), two dimers adopt an asymmetric orientation around the fivefold and twofold axes that triggers the formation of an icosahedral capsid (Figure 4D) [24]. Interestingly, the NTD structure exhibits large pores going from the outer to the inner layers that are about 12 to 25 Å in diameter depending on the axes from which they are observed in the icosahedral NTD capsid, by either X-ray [24] or cryo-EM [32–34] (for a review, [23]).

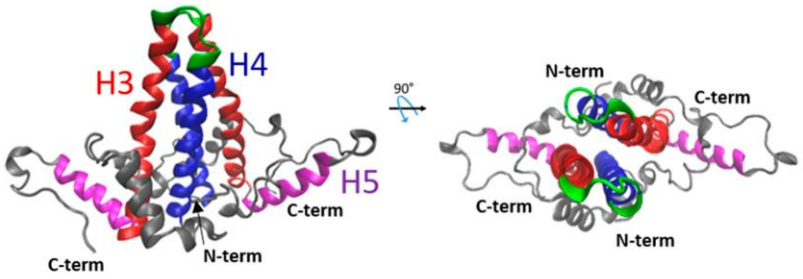


Figure 3. Representation of the 3D structure of the HBc–NTD dimer. Two orthogonal views of the HBc dimer are shown. This dimer structure was obtained from the Protein Data Bank (PDB) 1QGT [24]. Each monomer is formed of five α-helices. Helices 3 (red) and 4 (blue) display a hairpin shape assembling into a four-helical bundle within the dimer, generating the capsid spikes of the particle. The spike tip (in green) corresponds to the highly immunogenic c/e1 epitope [23]. The fifth helix (magenta) and the downstream proline-rich loop are involved in the dimer–dimer oligomerization.

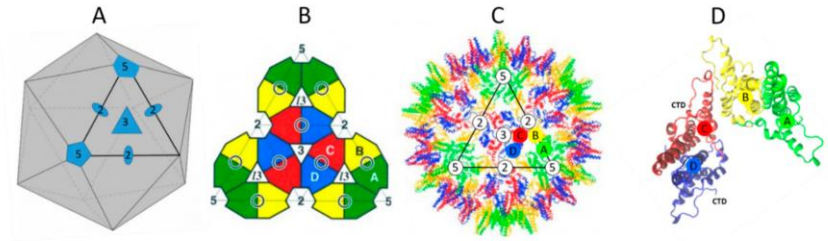


Figure 4. Dimer assembly in the T = 4 capsid. The HBV capsid structure was generated from cryo-electron microscopy (cryo-EM) analyses and X-ray crystallography (XR) with HBc proteins produced in vitro or from HBV-infected persons [23]. (**A**): Scheme of an icosahedron (adapted from [32]). It contains 20 facets (triangle) with the threefold axes going through the center of the opposite face, twelve fivefold axes (pentagon) going through the opposed vertices and fifteen twofold axes (oval) passing though the centers of the opposite vertices. (**B**): View of one icosahedron face through the threefold axis [24]. A, B, C and D correspond to 2 × 2 dimers and the central black ring corresponds to the four helix bundles. Subunit nomenclature and color were used according to [27,32]. (**C**): Structure of HBV capsid (T = 4) viewed from the threefold axis [24]. (**D**): A–B and C–D HBc dimers oriented to form the T = 4 capsid. These structures were obtained from the PDB, file 1QGT, and colored by using visual molecular dynamics (VMD) 1.9.3.

In addition to its role in the formation of the HBV capsid, the NTD is essential for envelope protein recruitment [30,35–37]. In fact, a series of residues mapping in the groove between the spikes and at the base of the spike was shown to be essential for the core to interact with L during the envelopment of the capsid [36,38]. Of note, the correlation between particle envelopment, found by Bruss et al. [36] using replication-competent particles, and the interaction between the core and L proteins in the absence of the HBV genome found by our group [38], favor the notion that the L-mediated egress of the HBV core is probably independent from core maturation. Thus, HBc–NTD is essential at several stages of the viral cycle and, consequently, is the target of an intense research for compounds endowing antiviral activity (for reviews, [19,20]).

with a plasmid expressing wt HBc or HBc derivatives, where S or T were replaced with A and incubated with [^{32}P] orthophosphate. (1) wt HBc STSSSS corresponds to the wild type (see Figure 2, numbers in brackets), (2) All serines were substituted for A while T162 was not (mut. ATAAAA), (3) S170 was maintained (mut. AAASAA), (4) S178 was maintained (mut. AAAAAS), (5) All phospho-acceptors were substituted for A (mut. AAAAAA), (6) S157, 164, 172 were substituted for A (mut. 3A-PRRR), (7) T162, S170 and S178 were substituted for A (mut. RRR-3A), (8) T162 was substituted for S (mut. SSSSSS), (9) pcDNA as control. Two days post transfection, HBc was immune-precipitated with anti-HBc antibody, and loaded onto SDS-PAGE and autoradiographied. Note that the presence of a single S (wells 3 and 4) or T (well 2) is enough for an efficient phosphorylation of HBc proteins. These results suggest that in the wt HBc only a few potent phospho-acceptor sites are phosphorylated. Modified from Figure 2B of [50] (IDccc: 1035507-2). Asterisk symbolizes a statistical difference between two samples.

3.1.2. Phosphorylation Can Be Mimicked by Acidic Residues (mP-HBc)

The role of each of these Ser/Thr residues was investigated by alanine substitution (UP-HBc) or by aspartic (D) or glutamic (E) replacement (mP-HBc). Alanine is neutral, while the D and E residues contain a carboxylate with a pKa of ~4. These residues are thus negatively charged at pH 7 and are considered to mimic the negative charge of the phosphate. Nevertheless, the phosphate group bound to S or T has either a single- or double-negative charge with a pKa of ~2 and ~7, which results in the mono- or bi-anionic state in the cellular environment [54]. Investigating as to whether the phosphate group is di-anionic or mono-anionic, notably during capsid assembly or during pgRNA packaging, would be essential for understanding the role played by phosphorylation/dephosphorylation in the course of virus replication.

3.1.3. Kinase Identity

Several kinase candidates have been proposed to phosphorylate the core protein, such as kinase A, polo-like kinase 1 (PLK1), CDK2, kinase C alpha (PKCα) or SRPK [50,51,55–58]. This identification is challenging due to the high number of kinases and phosphatases in mammalian cells [59]. When *Escherichia coli (E. coli)* was co-transformed with two plasmids coding for HBc and SRPK1, seven phosphorylation sites, all located in the CTD, were characterized [42,49]. Such a high phosphorylation level, as compared to the medium one as previously reported (Figure 6) [46–48,50], was considered to result from the co-expression of both proteins and the use of a soluble SRPK1 truncated protein. It remains that the exact quantification of CTD phosphorylation during virus replication is difficult to evaluate in infected hepatocyte cells due to the dynamic nature of CTD phosphorylation, varying as a function of the phases of the cell cycle. This would explain, at least in part, the localization of the core protein [46,60]. In addition, the identity of the associated phosphatases has not been investigated yet.

3.2. Phosphorylation Is Not Essential for Capsid Assembly

If HBc phosphorylation occurs soon after translation, it takes place independently from capsid assembly, i.e., the HBc-Y132A mutant is deficient in capsid assembly but is phosphorylated [61,62]. Along the same line, the phosphorylation of the HBc-F97L mutant was found to be similar to wt HBc despite small modifications of the NTD structure [33]. When a HBc mutant with a substitution of all phospho-acceptors for E (mP-HBc) or A (UP-HBc) is expressed in Huh7 cells, no significant difference is observed for HBc expression and isolated capsids [50]. The assembly of HBc was at least not influenced by the mutation of newly identified phosphorylation sites of the NTD [52].

The low impact of phosphorylation on capsid assembly is in line with the formation of highly phosphorylated but empty viral particles obtained with a HBV genome defective for the expression of the polymerase or present in the serum of treated patients [15]. This is also in agreement with the RNA-independent protein–protein interaction-driven mechanism of capsid assembly obtained without the CTD [63] and to the poor effect of phosphorylation on capsid structure [33,42,56].

3. The CTD Has Multiple Roles

A number of in vitro studies have shown that the NTD domain is necessary and sufficient for the formation of a capsid morphologically similar to capsids formed by the full length HBc. These studies led to the resolution of the NTD 3D structure and the identification of many parameters that govern capsid assembly [23]. Nevertheless, the NTD alone failed to assemble properly when purified from rabbit reticulocyte lysates, suggesting that the CTD is also required [39]. Moreover, our group recently showed, using fluorescence correlation spectroscopy (FCS), that HBc forms the capsid with an apparent Kd of 0.7–0.8 μM when expressed in Huh7 cells, while in this condition the HBc–NTD does not form capsids [7]. Thus, the CTD per se is not required for capsid formation but it facilitates the formation of the native shell capsid probably via RNA-binding as well as protein-protein interactions [33,39–42].

The CTD—which is highly conserved among all genotypes where substitutions are limited to the last five to seven residues (Figure 5)—exhibits two interesting features. Firstly, this short sequence of 34 (or 36) residues contains seven serines and one threonine, where seven of them could be phosphorylated (Figure 2, in red). As each phosphoryl group may carry one or two negative charges (see below), such a phosphorylation adds up to 14 negative charges per CTD (up to 14 × 240 = 3360 negative charges in the whole capsid). Secondly, the CTD contains 16 arginine residues (Figure 2, in green), forming a stable polycationic strand (16 × 240 = 3840 positive charges). Such a balance between the two sets of positive and negative charges is deemed essential for the proper regulation of the virus replication cycle.

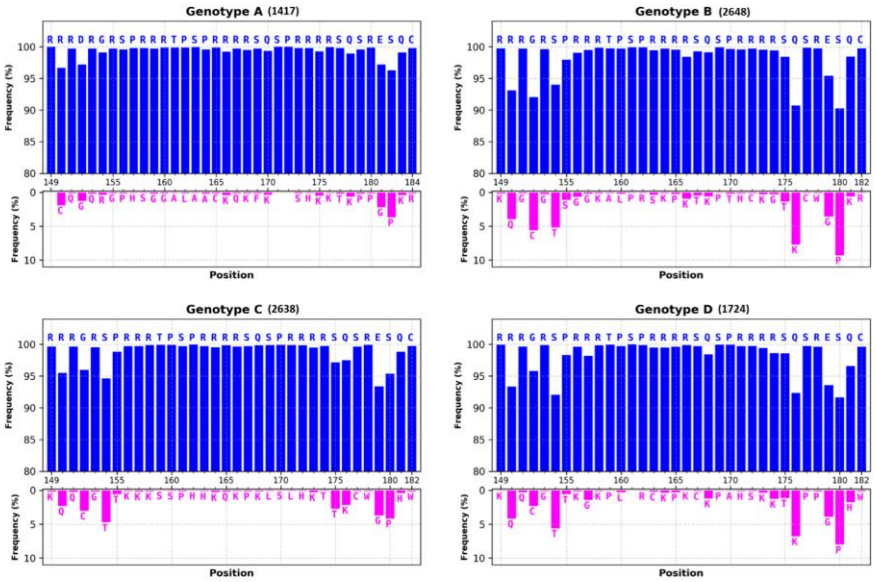


Figure 5. *Cont.*

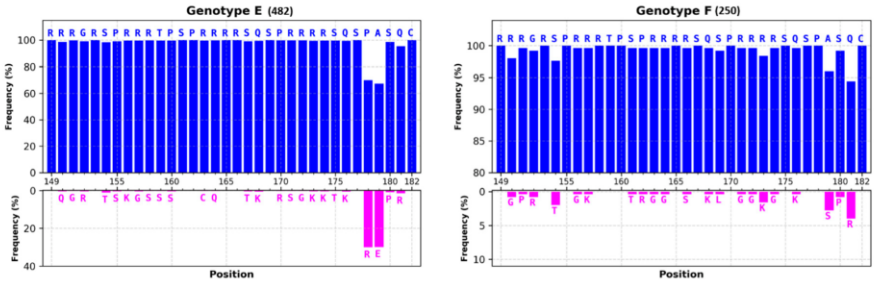


Figure 5. Conservation of the CTD amino acid sequences of the most prevalent genotypes. CTD sequences were extracted from the HBV database at Institut de Biologie Physico-Chimie (IBCP) IBCP (Lyon, France, https://hbvdb.ibcp.fr/HBVdb/). Numbers in parentheses correspond to numbers of analyzed sequences. Blue histograms correspond to overall conservation of residue at each position of the consensus sequence presented at the top of the graph. Pink histograms correspond to the most frequent substitution found in sequence alignment. Note that the genotype A CTD possesses two extra amino acids. Vertical axes represent frequencies of amino acid residues, expressed as percentage of conservation. In blue histograms, the axis was normalized between 80 to 100%, while in pink histograms, the axis was normalized between 0 to 10%, except for genotype E.

3.1. Phosphorylation of the CTD (P-CTD)

3.1.1. Most of HBc Phospho-Acceptors Are in the CTD

HBc is a phosphoprotein containing highly conserved phosphorylation sites located in the CTD (Figure 5). S155 (157), 162 (164) and 170 (172) are considered to be the major sites of phosphorylation [43–48]. Additional data identified a total of seven phosphorylation sites (S155, T160, S162, S168, S170 and S176) that are all in the CTD [42,49–51]. More recently, two serines (S44 and S49) amongst eleven S and twelve T residues in the NTD were also proposed as phospho-acceptors [52]. To further add to the complexity of amino acid phosphorylation, the phosphorylation of certain phospho-acceptors could enhance the phosphorylation of others [51,52], explaining, at least in part, why these sites play different roles in virus replication [42,43,47,50]. Taken together, these results propose that phosphorylation regulates electric homeostasis, which in turn drives pgRNA packaging, RT-directed synthesis of the rcDNA and capsid stability. Furthermore, the true number of negative charges is difficult to evaluate since three E residues are oriented toward the inner capsid (E46, E113 and E117) [53] and not all phospho-acceptors are phosphorylated at the same time (Figure 6) [50,52].

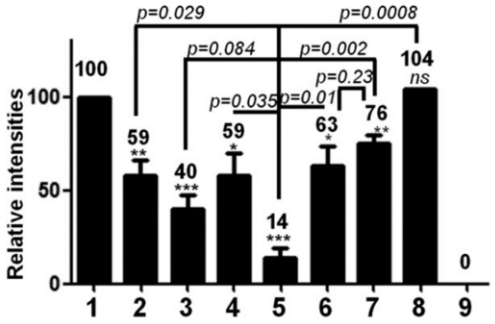


Figure 6. Not all S or T phospho-acceptors are phosphorylated at the same time. This histogram represents the relative intensities of phosphorylated HBc and HBc derivatives. Huh7 cells were

notably the binding, fraying and annealing of complementary sequences and the activation of the hammerhead ribozyme-directed cleavage of an RNA substrate [75,77].

The NAC activity of HBc was confirmed using DNA–DNA hybridization and hammerhead ribozyme cleavage in vitro [79]. Firstly, they monitored DNA annealing related to HIV-1 replication [80]—extensively used to follow NCp7, TAT and Gag NAC activity, Tar(+) and Tar(−) [76,81–83]—for duplex formation with increasing concentrations of assembled and disassembled capsids (Figure 7A). Interestingly, they monitored assembled (Figure 7A, lines 1–6) and disassembled HBc particles (Figure 7A, lines 7–11) and found that disassembled HBc was more efficient in facilitating duplex formation between Tar(+) and Tar(−). Note that in this assay, UP-HBc proteins were produced from *E. coli*. Using a series of HBc (147–183) peptides, they found that this chaperoning activity corresponded to the CTD sequence (Figure 7B). The partial deletion of ARD domains gave a significant decrease in Tar duplex formation but the relative importance of each ARD was not addressed. A kinetic analysis of HBc NAC would unravel by which pathway (kissing loop or stem) this duplex formation occurs [76].

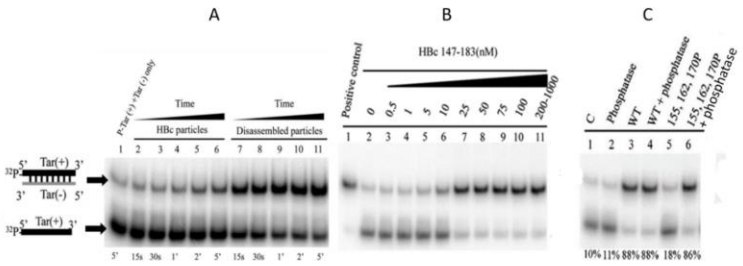


Figure 7. HBc and HBc (147–183) nucleic acid chaperone activity. (**A**): Tar(+)/Tar(−) duplex formation by assembled and disassembled capsids. (**B**): Tar(+)/Tar(−) duplex formation mediated by HBc (147–183) peptides. (**C**): Phosphorylation modulates Tar(+)/Tar(−) duplex formation. Tar(+) and Tar(−) were incubated with: Line 3, UP-HBc (147–183); Line 4, HBc (147–183) treated with protein phosphatase; Line 5, P-HBc (147–183) at positions S 155, 162 and 170; Line 5, P-HBc (147–183) at positions S 155, 162 and 170 treated with protein phosphatase. Panels A, B and C were respectively derived from Figures 1, 3 and 5 of [79] (IDccc: 1035507-1).

4.3. Interaction of HBc with dsDNA

HBc was shown to interact in vitro with single- and double-stranded DNA, but the assembly of HBc onto dsDNA mostly led to the formation of large and heterogeneous complexes [84,85]. Nevertheless, HBc-dsDNA may be required for the formation of an HBc–cccDNA (covalently closed circular DNA) complex. Along this line, interaction may explain the localization of HBc in the nucleus. Bock et al. performed the immuno-precipitation of histones from the HBV-producing HepG2.2.15 cells and found histone proteins combined with both HBc protein and cccDNA [86,87]. These results were confirmed by transmission electron microscopy (TEM) with the identification of cccDNA decorated by HBc, showing a typical beads-on-a-string structure. Note that HBc was probably phosphorylated, because immuno-precipitation was performed from HepG2.2.15 extracts. Interestingly, they also found that HBc—monomeric but phosphorylated (from rabbit reticulocyte lysate)—interacted more tightly with HBV dsDNA as compared with HBV ssDNA or nonspecific DNAs [86]. Using in vitro-reconstituted HBV minichromosomes, they found that HBc molecules form an irregular chromatin organization with rcDNA while it was a regular chromatin assembly, notably with HBV dsDNA. The addition of HBc to the nuclear extracts of *Xenopus* oocytes (S150 extract), containing HBV DNA, induced the foreshortening of nucleosome spacing, suggesting that HBc directly participates in HBV cccDNA chromatin organization, which could regulate HBV transcription. This effect of HBc cccDNA organization was recently confirmed by chromatin immuno-precipitation

Nevertheless, wild-type capsids obtained from *E. coli* (UP-HBc) are less stable than capsids formed by mP-HBc where S155, S162 and S170 (see Figure 2, unbracketed numbers) were substituted for E [64]. This instability of wt capsids can be explained by the electrostatic repulsions of arginine residues, which are titrated by the glutamic acid residues in mP-HBc. As shown in Figure 6, HBc is always partially phosphorylated in a cellular context, as mimicked by mP-HBc in vitro. These observations favored the notion that the partial phosphorylation of CTD ensures a high stability of the HBV capsid.

4. The CTD Interacts with Nucleic Acids (NAs)

4.1. Role of Arginine Rich Domains (ARDs) in HBV Replication

The CTD sequence has been referred as to a protamine-like domain holding RNA or DNA binding facility [65,66]. It was thus proposed that the HBc–CTD has a histone-like function promoting DNA condensation [45]. CTD contains 16 R residues (Figure 2, green letters, I, II, III and IV) organized in four distinct domains ARDs [67], which are commonly found in RNA- and DNA-binding proteins (for a review, [68]). This arrangement is probably essential for different functions since it is conserved among human hepadnaviruses (Figure 5). Nevertheless, the first domain seems a little less preserved, with the replacement of R150 by other residues and of S155 by a threonine. In duck hepatitis B virus (DHBV), a model frequently used to characterize how hepadnaviruses replicate, the core protein is larger (262 residues) and contains the same basic residues, but they are scattered throughout the primary sequence [69].

Using partial CTD deletion or the substitution of R to A mutants, the four arginine stretches were originally proposed to have a specific role, notably, the first two arginine residues being more important for RNA binding and pgRNA packaging, while the two distal rows for DNA binding and reverse transcription [44,45,48,53,70]. For example, the truncated mutant HBc164, which contains the two first ARDs and one arginine of the third ARD cluster, efficiently packages shorter 2.2-kb spliced RNA rather than the entire wild-type 3.2-kb pgRNA [44,45,48]. Intriguingly, the 3′ end of the packaged pgRNA in the HBc164 capsid remained accessible to nuclease, suggesting that the 3′ end was protruding outside the capsid [48,71]. When HBc164 CTD was extended to arginine 173, a full length HBV genome was then obtained, while additional R residues (pos. 174, 175 and 179) were not required for DNA replication [48].

4.2. ARDs Endowed with NA Chaperone Activity

The relative importance of the ARDs at different stages of viral replication has been addressed by a thorough quantitative analysis of pgRNA packaging and (-) and (+)DNA synthesis, with mutants where the four clusters were substituted with A or K [72]. During the initial step of reverse transcription, where (-)cDNA anneals to the 3′ DR1 sequence [4], the alanine substitution in clusters II, III and IV impaired the minus strand template switch, causing a large decrease in (-)cDNA completion. Subsequent steps of DNA synthesis up to rcDNA completion were all affected at various levels by R–A substitution, I and II for (-)DNA elongation, III and IV for primer translocation, and all mutants had decreased DNA circularization and (+)cDNA elongation.

This allowed the group of Loeb to suggest that the core protein has nucleic acid chaperone (NAC) activity [72]. This NAC activity is well described as impacting the structure of abundant coding and non-coding RNA molecules, from prokaryotes to eukaryotes [73,74]. Briefly, this activity directs a transient destabilization of the NA structure and promotes the annealing of complementary NA sequences [75–77]. A few common properties allow for distinguishing RNA chaperones from other RNA-binding proteins: a lack of specificity for RNA or DNA, they are transiently needed, and there is no energy requirement for their activity. HBc does not share sequence similarities with other viral proteins, such as HIV-NCp7, HIV-TAT or HCV core protein, described as NAC factors, however, that all these proteins are highly basic and flexible so that they can adapt to the order–disorder transition according to their substrates [78]. A number of standard assays are used to monitor NAC activity,

(ChIP) assays [88]. The HBc-mediated pull-down of cccDNA was not affected when all R residues of cluster I were substituted for G. In contrast, the substitution of R for G in clusters III and IV drops the level of pulled-down cccDNA by a factor 10 and significantly lowers the level of HBV RNA, showing again that all R clusters are not equivalent in virus replication, notably during cccDNA transcription.

4.4. Specific Interaction between the CTD and NAs

As aforementioned, the negative environment during the first step of assembly in insect or mammalian cells prevents the nonspecific interaction with negatively charged cellular RNAs [15,42,48,53]. In the current model describing the recognition of pgRNA among the bulk of cellular RNAs, it is proposed that the newly synthetized capsid specifically recognizes the pgRNA–Pol complex [89]. This model would suggest that HBc exerts only a nonspecific interaction with NAs and does not actively participate in the direct packaging of its cognate RNA. Recent experiments revisited this relationship between capsid assembly and CTD-mediated pgRNA interactions [40]. First, a Systematic Evolution of Ligand by Exponential Enrichment (SELEX) approach identified three high-affinity binding sites for HBc dimers (Figure 8A, upper panel). These sites, referred to as preferred sites (PS1, PS2 and PS3), were proposed to act as packaging signals to specifically drive pgRNA packaging during HBc assembly. The importance of PSs for capsid formation was investigated by FCS. This technique monitors the fluorescence fluctuation of particles diffusing through the confocal volume, and the analysis of fluorescence fluctuation by an autocorrelation function allows the extraction of the hydrodynamic radius Rh (radius of the particle) [90]. Combining this highly sensitive technique and high-affinity RNAs allowed the authors to work at nanomolar range concentrations, which are supposed to be more relevant to in vivo conditions.

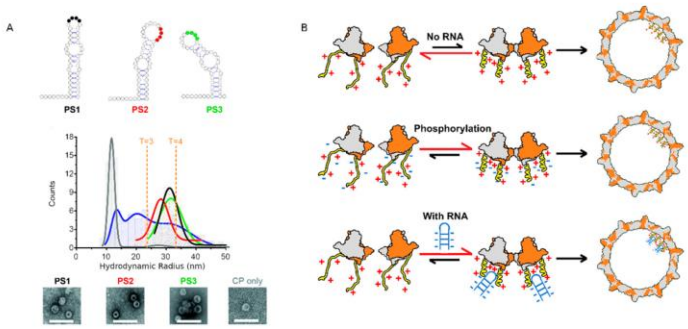


Figure 8. High-affinity binding site (preferred site, PSs) trigger sequence-specific Viral Like Particle (VLP) assembly. (**A**) Dye end-labeled RNA oligos, encompassing PS1 (black), PS2 (red) or PS3 (green), were each assessed for their ability to form VLPs at nanomolar concentrations using single molecule Fluorescence Correlation Spectroscopy (smFCS). PS oligonucleotides were present at a concentration of 15 nM. FCS data were collected in 30 sec bins, and data collected after the addition of 250 nM HBc dimers (taken to be the endpoint of assembly) were then plotted as hydrodynamic radial distributions (middle panel). Unlabeled RNA oligos, encompassing PS1 (blue) and HBc alone (gray), were also assessed for the ability to form VLPs at identical concentrations. At the end of these reactions (after the addition of 250 nM Hbc dimers), HBc was labeled with Alexa Fluor-488 and FCS data were collected in 30 sec bins for 100 min. The resulting R_h distributions were plotted as above. Note, the dye-labeling of the HBc dimers prevents them from assembling, implying that this is an end-point measurement. The successful assembly of T = 4 VLPs results in a labeled species of R_h ~33–38 nm, as seen by TEM, in assemblies with PS oligonucleotides (lower panel). HBc only assembles predominantly in species with an R_h of 10–11 nm (gray), suggesting that the self-association of dimers is slow in the absence of PS RNA. (**B**) Model for CTD-mediated HBc assembly. NTD dimers are in gray and orange, CTD in yellow and the RNA in blue. A kind gift from N. Patel and P.G. Stockley.

FCS data collected after the addition of 250 nM HBc dimers to a fixed concentration of labeled PSs were plotted as hydrodynamic radial distributions (Figure 8A, middle panel). This distribution, in addition to the shape of the capsid (Figure 8A, TEM images at the bottom) and to the sensitivity of particles to RNAse (not shown), was similar for the three PSs, suggesting that capsid morphogenesis was independent from this three PS sequences. In contrast, HBc assembly using PS-mutated RNAs or corresponding to epsilon or a DNA version of PS1 remained highly sensitive to RNAse, suggesting that the condensation of the nucleocapsid shell was specific to the RNA sequence and structure (not shown). Next, capsid assembly was followed without RNA (Figure 8A, grey line) or with unlabeled RNA (Figure 8A, blue line) and then fluorescently labeled. In the absence of RNA, HBc assembles predominantly in species with an Rh of 10–11 nm (gray), suggesting that the self-association of dimers is slow in the absence of PS RNAs, even though the low amount of assembled particles look like wild-type particles (Figure 8A, TEM images bottom right). The ability of HBc149 to interact with PS1 was assessed by FCS and the absence of an Rh increase clearly shows the absence of RNA-mediated HBc149 assembly, despite the formation of a HBc149 capsid observed by TEM (not shown). Thus, as expected, the truncation of the CTD does not hamper the formation of the capsid but is essential for RNA-dependent HBc assembly. Note that in this study, UP-HBc was purified from *E. coli*, and was thus highly positive. In this model using a low HBc concentration, UP-HBc alone forms few capsids (Figure 8B, upper panel). A higher concentration of HBc dimers is required for RNA-independent capsid assembly to bypass the repulsion of ARD positive charges. Thus, the absence of CTD (HBc149) or the reduction of charges by phosphorylation reduces repulsion forces, allowing the formation of particles at low concentrations (Figure 8B, middle panel). Conversely, in the presence of specific RNA, UP-HBc efficiently self-assembles (Figure 8B, lower row). Therefore, this study suggests that in vivo, at low concentrations, UP-HBc dimers probably recognize specific RNA structures similar to the structures identified here, which in turn would nucleate HBc assembly.

5. RNA Packaging Is Tuned by Phosphorylation and by the Nature of NAs

5.1. Effect of Phospho-Acceptor Modifications on RNA Packaging

UP-HBc capsids purified from *E. coli* are un-phosphorylated due to the absence of cognate kinases and being full of *E. coli* RNAs [42,45,49], while P-HBc capsids from insect and mammalian cells are empty of (host) RNAs if they are incompetent for pgRNA packaging [15]. UP-HBc capsids package RNAs 3400 nt in length close to the pgRNA size (3500 nt) [48,53]. The assembly of capsids expressed in Rabbit Reticulocyte Lysate (RRL), *E. coli* or 293T, where a few phospho-acceptors (three among seven) or all phospho-acceptors (seven) were changed to A (+ charges ↑), giving rise to PP-HBc and UP-HBc, resulted in the formation of capsids in a process dependent on the presence of host RNAs, concomitantly with a large decrease in pgRNA packaging [39,47,50,53]. These results are in line with the role of phosphorylation to prevent the packaging of cellular RNAs to the benefit of viral RNA.

In contrast, when these phospho-acceptors were changed to E/D (mP-HBc) (+ charges ↓) and the capsid was produced in RRL or 293T or when HBc was co-expressed with SRPK1 kinase in *E. coli* (+ charges ↓), giving rise to P-HBc, then capsid assembly was RNA independent, i.e., VLPs were found to contain a low amount of host RNAs [39,42,56]. Additionally, the double mutation of the S44–S49 in E (+ charges ↓) was also found to partially impair pgRNA packaging [52]. However, the two residues are not located in the CTD and probably do not directly interact with pgRNA. Interestingly, when ARDs were substituted for A (+ charges ↓), both pgRNA packaging and DNA synthesis were decreased [72], underlining the intimate balance between positive charges (arginine residues) and negatives charges (phosphorylation).

A scheme of this electrostatic equilibrium for RNA packaging is reported in Figure 9 [53]. The substitution of two or four arginine residues for AA in ARDs (+ charges ↓) proportionally decreases the size of the viral DNA and increases the amount of shorter packaged viral and spliced RNAs (Figure 9, VLPs 1 and 2). Of notes, in the quadruple mutant (AA substitution in the four ARDs), the height

among the sixteen R residues remains in HBc, thus explaining the residual P-HBc-RNA interaction. Next, residues E40, E46, E113 and E117 located in the inner surface of the capsid shell and E180 located at the end of the CTD were substituted for A in double (or quadruple ARD) mutants (+ charges ↑) and a clear rescue of RNA was observed, suggesting that negatively charged glutamic residues participate in the titration of arginine positive charges (Figure 9, VLP 3). Similarly, when S155, 162 and 170 were substituted for A to mimic de-phosphorylation in the ARD mutants (+ charges ↑), it was found that a shorter DNA phenotype was rescued to produce longer DNA, as well as longer packaged RNA (Figure 9, VLP 4), in agreement with studies showing the strong impact of phosphorylation status on RNA packaging [43,47,72,91]. Altogether, electrostatic homeostasis plays an important role in the CTD–NA interaction that, in turn, regulates RNA packaging.

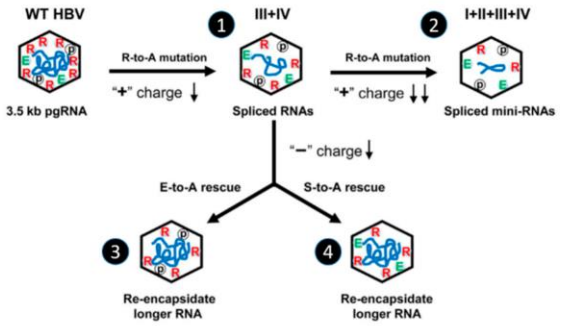


Figure 9. A subtle charge balance is required for RNA packaging. ARDs were mutated (R substituted for A) to reduce the positive charges and the status of packaged RNA is schematically shown by the blue line (pgRNA, 2.2-kb spliced RNA, 1.5 spliced mini-RNA). III + IV corresponds to HBc proteins where R165, 166, 173 and 174 of the third and the fourth ARDs were substituted for A. I + II + III + IV corresponds to HBc protein where R151, 153, 157, 158, 165, 166, 173 and 174 of all ARDs were substituted for A. The lower amount of positive charge of III + IV can be rescued by E–A or S–A substitution. This result suggests that the relative ratio of positive to negative charge appears more important than the quantity of either positive or negative charges for RNA packaging. Extracted and modified from Figure 7 of [53] and published under a CC BY 4.0 license.

5.2. Phosphorylation Causes a Decrease in HBc-NA Interaction In Vitro

The ability of P-HBc extracted from Dane particles to bind HBV DNA in vitro was increased after de-phosphorylation (+ charges ↑) [84]. Conversely, when the HBc (147–183) peptide was phosphorylated at positions S155, 162 or 170 (+ charges ↓), a progressive inhibition of DNA annealing was observed and the phosphorylation state of these three serine residues completely abolished the DNA annealing activity (Figure 7C). The higher the serine phosphorylation of the HBc proteins was, the lower the DNA annealing activity and duplex formation. The treatment of the P-HBc (147–183) peptide by phosphatase restores the HBc (147–183) DNA-annealing activity (Figure 7C). In this assay, the effect of phosphorylation on the interaction between HBc and nucleic acids was monitored with non-specific substrates, favoring the notion that low-affinity complexes are formed. However, Stockley's group also monitored the effect of phosphorylation on a more specific complex formed between HBc and PS1 [40]. To that end, HBc was phosphorylated prior to or during the interaction with PS1 (+ charges ↓) and in both cases P-HBc lost the PS1-binding activity but not capsid formation (Figure 8B). In the same vein, when S44 and S49, as potent photo-acceptors, were both substituted for E (+ charges ↓) in the NTD, a decrease in the interaction between HBc and rcDNA was observed [52].

5.3. Phosphorylation and RT Activity

HBV capsids, as well as DHBV capsids, purified from the cytoplasm are extensively phosphorylated, in contrast to virions purified from cell supernatant or from patient sera, suggesting that de-phosphorylation takes place during virion maturation [92,93]. In fact, intracellular and immature DHBV and HBV capsids were found heterogeneously phosphorylated, while mature capsids and virions were found dephosphorylated [94–96], even though cell-free particles contained P-HBc [42]. Nevertheless, the group of J. Hu reported that capsids of genome-free virions (referred to as empty virions) and naked capsids found in the cell culture supernatant or empty virions in the patient blood were extensively phosphorylated [96] (see a recent review in [11]). Taken together, these data suggest that the phosphorylation level is independent from virus production but rather relies on RT activity.

The correlation between RT activity and phosphorylation was first studied in the DHBV model. Using ultra-centrifugation methods to separate immature (RNA-containing) capsids, mature (dsDNA-containing) capsids and secreted virions, it was found that HBc in mature capsids and virions was dephosphorylated in contrast to immature capsids in which HBc was phosphorylated [95]. The link between de-phosphorylation and RT activity was also observed in the DHBV model, where the phospho-acceptors S (or T), substituted for D, impaired DNA synthesis [97] but not RNA packaging [98]. Likewise, when S was mutated for E in the HBV model, only a slight effect on pgRNA packaging was observed but single or double mutants containing E analogs hardly supported DNA replication [47,50]. More recently, the link between the HBc–RNA interaction and de-phosphorylation was demonstrated using the HBV model thanks to the use of antibodies specific for CTD phosphorylation [62]. Firstly, it was found that unassembled capsids were hyper-phosphorylated, in agreement with the phosphorylation status of empty capsids [96], while assembled capsids, produced from pgRNA encoding for the Y63F mutant DNA polymerase and containing only pgRNA, were mainly hypo-phosphorylated [62]. Taken together, these results suggest that, during the pre-assembly process, phosphorylation most probably causes a decrease in the affinity of capsids for cellular RNAs, and once assembly is kickstarted by the formation of the pgRNA–Pol complex, de-phosphorylation occurs in order to increase the HBc–pgRNA interaction and trigger RT activity through its NAC properties.

6. The CTD Localization during the Virus Replication Cycle

The structure of the CTD has not been solved yet but it is entirely possible that, due to its high content of basic residues, the CTD can adopt many different conformations. This conformational flexibility has indeed been found to be essential for modulating the CTD-mediated interaction of HBc with pgRNA in response to its phosphorylation status [34]. Interestingly, the position of the C-terminus in the native capsid has long been a matter of debate (Table 1). Early studies comparing native and disrupted core particles [99], or using proteinase digestion, have shown that the C-terminus faces the interior of the capsid [100–102]. This internal localization was also proposed by using radiolabeled HBc [103] and by measuring the binding to Ni^{2+} -NTA beads of NTD–His tags [104]. However, the requirements of the CTD during cytosolic transport, the anchorage of the capsid to the nuclear pore and nuclear import are not compatible with a permanent luminal localization of the arginine-rich domain [105–107]. Several observations favor the notion that this domain can protrude from the surface of the capsid.

CTD accessibility was investigated with different types of capsids produced in mammalian cells or *E. coli* [94]. For example, when maturated capsids (MatC) were purified, the unphosphorylated CTD was totally hydrolyzed by trypsin, in contrast to the phosphorylated CTD of immature capsids (Immat C) that were only partially hydrolyzed (see Figure 10). When UP-HBc capsids were obtained from *E. coli*, then the tight nonspecific interaction of *E. coli* RNAs prevented the UP-CTD exposure that becomes resistant to trypsin digestion. Interestingly, in similar conditions, when UP-HBc capsids were submitted to a denaturation–renaturation process (NA-free), the UP-CTD domain was partly exposed on the surface of the capsid [65,94] (Table 1). In conclusion, unspecific RNA traps the UP-CTD of *E. coli* (EcC) and specific RNA partially traps P-CTD inside the HBV capsid, while DNA excludes P-CTD,

which is then dephosphorylated (MatC) (Table 1 and Figure 10). So, the RT-mediated conversion of pgRNA to dsDNA results in the exposure of the CTD on the surface of the capsid (see structure) [41].

Table 1. Different localizations of the CTD.

		Phosphorylated	Unphosphorylated
RNA	pgRNA	In (partial) [94] In [34]	In [34]
	Unspecific RNA	In (partial) [94] In [56]	In [94,103] In (partial) [42,108]
DNA		Out [84]	Out [94,95,109]
Empty		Out (partial) [42,56,65]	Out (partial) [34,56,64,65]

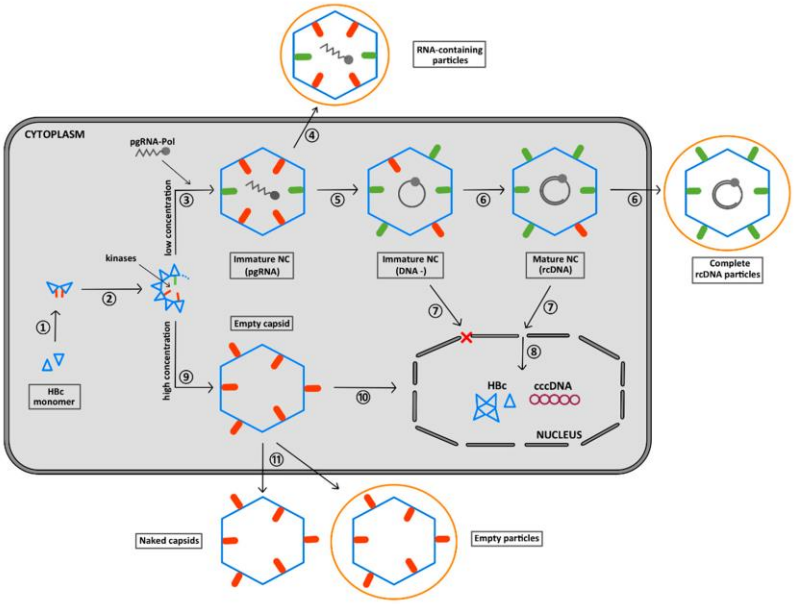


Figure 10. Phosphorylation and CTD exposure during HBV replication. CTD localization is presented inside and outside capsids as small rounded bars. Phosphorylated CTDs are in red, while unphosphorylated CTDs are in green. Numbers correspond to the different steps during which phosphorylation and/or CTD flips possibly occur.

In the work of Zlotnick and collaborators, capsids were produced in *E. coli* and RNAs were removed [64]. Wild-type UP-HBc and mP-HBc capsids were treated by trypsin and a clear accumulation of an HBc fragment corresponding to 1–157 was observed for both capsids [64], suggesting that, in both cases, the CTD protrudes from the surface of the capsid, as shown by cryo-EM [34]. Nevertheless, the CTD of wild-type UP-HBc was hydrolyzed faster than the CTD of mP-HBc, suggesting that the neutralization of CTD positive charges by EEE residues results in the stabilization of mP-HBc capsids. Similar results were obtained by comparing *E. coli*-derived UP-HBc_F97L and P-HBc_F97L sensitivity to trypsin treatment [42]. The structure of HBc_F97L is highly similar to that of wt HBc, with a small enlargement of the hydrophobic pocket in the spikes [33]. In UP-HBc_F97L capsids, the CTD was partly deleted while the CTD of P-HBc_F97L presented intermediate hydrolyzed products and was

then entirely hydrolyzed. Note that in this work, UP-HBc contained large amounts of bacterial RNAs, while P-HBc was RNA-free, in line with the decrease in HBc–NA affinity when HBc is phosphorylated. In line with these results, UP-HBc (without RNA) capsids were able to interact with SRPK1, a SR protein kinase specific for CTD, while neither HBc149 nor RNA-filled UP-HBc showed SRPK1 binding, emphasizing that in empty and UP-HBc capsids, the CTD is protruding outside the capsid [56] (Table 1).

This flip from the interior to the exterior of the capsid is consistent with the flexibility of the linker peptide (residues 143–149) and to numerous pores on the capsid surface [24,42,110]. By cryo-EM, the pores of empty and UP-HBc capsids appear partially occluded by the surface-exposed CTD, while in pgRNA-containing UP-HBc particles, pores remain accessible [34]. In contrast, the structure of full-length HBc capsids purified from *E. coli* and full of *E. coli* RNAs, obtained at a 3.5Å resolution by cryo-EM, revealed the exposure of the CTD at the capsid surface [108]. The nature of the nucleic acid involved in the regulation of CTD exposure is important. As a matter of fact, the affinity of CTD for bacterial RNA may be lower than for pgRNA, which may explain why the CTD of a capsid full of unspecific RNAs may float on the surface of the capsid, while the CTD of a capsid harboring specific pgRNA may be sequestered within the capsid.

7. Summary of the Role of the CTD Phosphorylation during HBV Morphogenesis

The initial step of HBV morphogenesis only necessitates the HBc–NTD that self-assembles via protein–protein interactions (Figure 10, ①, ②) [24,111]. Concomitant with HBc–NTD assembly, the recruitment of a kinase takes place [40,51,53,64] (Figure 10, ②). Up to seven phospho-acceptor sites located in the CTD and possibly two in the NTD could be phosphorylated (red bars). However, only some of them appear sufficient for pgRNA packaging [48,50–53]. CTD phosphorylation occurs within the shell by a capsid-trapped kinase [112] or together with oligomer formation, with, however, no influence per se on capsid shape [33,34,42,61,62], but rather on the kinetics of assembly [7,40]. This phosphorylation regulates the electrostatic homeostasis of this molecular assembly, thus preventing the electrostatic repulsion of the arginine positive charges. HBc-CTD then might be oriented predominantly inside the nascent capsid. This process appears to be self-controlled since the HBc–SRPK1 complex responds to the degree of phosphorylation [56]. At this step of the replication cycle, the HBc–CTD might not be fully phosphorylated (green bars in immature capsids) but it may be enough to prevent the packaging of cellular RNAs and trap the CTD domain in the interior of the nascent capsid [53,64,94] (Table 1).

It is likely that, at this stage of the viral cycle, two assembly pathways could be distinguished. The first assembly path occurs at a low concentration of HBc, where a subpopulation of unphosphorylated dimers (UP-HBc in green) specifically interact with pgRNA (Figure 10, ③) [40]. When pgRNA translation takes place on the polysome machinery, Pol and HBc are synthesized at the same time, greatly facilitating local RNA–protein interactions mediated by their respective high-affinity binding sites [40,89,113,114]. This results in the specific packaging of the viral RNA in a replication-competent capsid [115]. Consistent with this view, pgRNA serves as a platform directing the HBc–HBc interactions and condensation necessary for capsid completion [116]. Even though RNA-containing particles could be secreted [11] (Figure 10, ④) it is likely that, concomitant with capsid formation, RT, assisted by the nucleic acid chaperone activity of HBc, starts the synthesis of the (-)cDNA strand (Figure 10, ⑤) [72,79]. The formation of dsDNA (rcDNA), also referred to as the maturation process, increases the number of negative charges. This induces a repulsion of the P-CTD (red bars) [34,64,85] that is then exposed to the surface of the capsid thanks to the flexibility of the linker [42,110] and to the multiple holes in the capsid shell [24,32–34,84,94] (Table 1). Alternatively, taking into account that CTDs are heterogeneously phosphorylated, it is possible that a population of P-CTDs remains outside of the capsid during assembly and, conversely, only the UP-CTD ones, interacting with the pgRNA, remain within the capsid. Regardless of the model, mature viral particles are characterized by the exposure of several P-CTDs extruded out of the capsid that might be partly dephosphorylated (green bars), in agreement with the unphosphorylated status of complete secreted

virions (Figure 10, ⑥) [56,95,96]. For non-secreted particles, their phosphorylated nuclear localization signal (NLS) located in the CTD is then used to dock mature (or immature) capsids on nuclear pores (NPCs) (Figure 10, ⑦) of the nuclear envelope, notably through the importins α and β [107], where only the mature capsid is disassembled [22] (Figure 10, ⑧). The brittleness of the maturated capsid induced by the rigidity of the DNA [41,85] and its phosphorylation status would direct particle dissociation so as to release the viral genome into the host cell nucleus [52,94,117], where cccDNA formation occurs, establishing chronic infection [8]. The second assembly pathway could occur at higher protein concentrations as an RNA-independent assembly pathway (Figure 10, ⑨). The gradual increase in protein concentration compensates for the weak protein–protein interactions [63], allowing the formation of large amounts of empty P-HBc particles [96]. Such empty capsids with exposed and phosphorylated CTDs (Table 1) can then be transported to the nucleus [22,105] but through an importin-β-dependent pathway (Figure 10, ⑩) [118] or secreted as naked or enveloped particles (Figure 10, ⑪) [11].

In conclusion, the CTD has pleiotropic functions that take place during the initial step of HBV morphogenesis, which are all tightly regulated by the electrostatic homeostasis carried out by serine and threonine phosphorylation that counterbalances ARD motifs.

Funding: This work was supported by the INSERM, ANRS and Tours University.

Acknowledgments: We thank Pierre-Ivan Raynal from the Electron Microscopy (EM) Facility (IBiSA) of Tours University (http://microscopies.med.univ-tours.fr) for the analysis of CTD sequence alignments. Personal thanks are due to Nikesh Patel and Peter G. Stockley (Astbury Centre for Structural Molecular Biology, University of Leeds, Leeds LS2 9JT, UK) for Figure 10.

Conflicts of Interest: Authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

HBV: hepatitis B virus; HBc: HBV core protein; CTD: C-terminal domain; NTD: N-terminal domain; P-HBc: phosphorylated HBc-183 (wt); UP-HBc: unphosphorylated HBc-183; PP-HBc: partly phosphorylated HBc-183; mP-HBc: mimic phosphorylated HBc-183; P-CTD: phosphorylated CTD; UP-CTD: unphosphorylated CTD; PP-CTD: partly phosphorylated CTD; Pol: polymerase; RT: reverse transcriptase; pgRNA: pre-genomic RNA; cccDNA: covalently closed circular DNA.

References

1. Neuveut, C.; Wei, Y.; Buendia, M.A. Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis. *J. Hepatol.* **2010**, *52*, 594–604. [CrossRef]
2. Liang, T.J.; Block, T.M.; McMahon, B.J.; Ghany, M.G.; Urban, S.; Guo, J.T.; Locarnini, S.; Zoulim, F.; Chang, K.M.; Lok, A.S. Present and future therapies of hepatitis B: From discovery to cure. *Hepatology* **2015**, *62*, 1893–1908. [CrossRef] [PubMed]
3. Seeger, C.; Mason, W.S. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology* **2015**, *479–480*, 672–686. [CrossRef]
4. Nassal, M. Hepatitis B viruses: Reverse transcription a different way. *Virus Res.* **2008**, *134*, 235–249. [CrossRef] [PubMed]
5. 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. [CrossRef] [PubMed]
6. Ni, Y.; Lempp, F.A.; Mehrle, S.; Nkongolo, S.; Kaufman, C.; Falth, M.; Stindt, J.; Koniger, 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. [CrossRef] [PubMed]
7. Rat, V.; Pinson, X.; Seigneuret, F.; Durand, S.; Herrscher, C.; Lemoine, R.; Burlaud-Gaillard, J.; Raynal, P.Y.; Hourioux, C.; Roingeard, P.; et al. Hepatitis B Virus Core Protein Domains Essential for Viral Capsid Assembly in a Cellular Context. *J. Mol. Biol.* **2020**. [CrossRef]
8. Nassal, M. HBV cccDNA: Viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut* **2015**, *64*, 1972–1984. [CrossRef]
9. Blumberg, B.S. Australia antigen and the biology of hepatitis B. *Science* **1977**, *197*, 17–25. [CrossRef]

10. Bruss, V. Hepatitis B virus morphogenesis. *World J. Gastroenterol.* **2007**, *13*, 65–73. [CrossRef]
11. Hu, J.; Liu, K. Complete and Incomplete Hepatitis B Virus Particles: Formation, Function, and Application. *Viruses* **2017**, *9*, 56. [CrossRef] [PubMed]
12. Gilbert, R.J.; Beales, L.; Blond, D.; Simon, M.N.; Lin, B.Y.; Chisari, F.V.; Stuart, D.I.; Rowlands, D.J. Hepatitis B small surface antigen particles are octahedral. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 14783–14788. [CrossRef] [PubMed]
13. Patient, R.; Hourioux, C.; Roingeard, P. Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles. *Cell. Microbiol.* **2009**, *11*, 1561–1570. [CrossRef] [PubMed]
14. Cova, L. Advances and challenges in the development of therapeutic DNA vaccines against hepatitis B virus infection. *Curr. Gene Ther.* **2014**, *14*, 149–160. [CrossRef] [PubMed]
15. Ning, X.; Nguyen, D.; Mentzer, L.; Adams, C.; Lee, H.; Ashley, R.; Hafenstein, S.; Hu, J. Secretion of genome-free hepatitis B virus–single strand blocking model for virion morphogenesis of para-retrovirus. *PLoS Pathog.* **2011**, *7*, e1002255. [CrossRef]
16. Peiffer, K.H.; Akhras, S.; Himmelsbach, K.; Hassemer, M.; Finkernagel, M.; Carra, G.; Nuebling, M.; Chudy, M.; Niekamp, H.; Glebe, D.; et al. Intracellular accumulation of subviral HBsAg particles and diminished Nrf2 activation in HBV genotype G expressing cells lead to an increased ROI level. *J. Hepatol.* **2015**, *62*, 791–798. [CrossRef]
17. Chen, M.T.; Billaud, J.N.; Sällberg, M.; Guidotti, L.G.; Chisari, F.V.; Jones, J.; Hughes, J.; Milich, D.R. A function of the hepatitis B virus precore protein is to regulate the immune response to the core antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 14913–14918. [CrossRef]
18. Zlotnick, A.; Mukhopadhyay, S. Virus assembly, allostery and antivirals. *Trends Microbiol.* **2011**, *19*, 14–23. [CrossRef]
19. Schinazi, R.F.; Ehteshami, M.; Bassit, L.; Asselah, T. Towards HBV curative therapies. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* **2018**, *38* (Suppl. S1), 102–114. [CrossRef]
20. Asselah, T.; Loureiro, D.; Boyer, N.; Mansouri, A. Targets and future direct-acting antiviral approaches to achieve hepatitis B virus cure. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *4*, 883–892. [CrossRef]
21. Liu, K.; Hu, J. Secretion of empty or complete hepatitis B virions: Envelopment of empty capsids versus mature nucleocapsids. *Future Virol.* **2019**, *14*, 95–105. [CrossRef]
22. Gallucci, L.; Kann, M. Nuclear Import of Hepatitis B Virus Capsids and Genome. *Viruses* **2017**, *9*, 21. [CrossRef] [PubMed]
23. Venkatakrishnan, B.; Zlotnick, A. The Structural Biology of Hepatitis B Virus: Form and Function. *Annu. Rev. Virol.* **2016**, *3*, 429–451. [CrossRef] [PubMed]
24. Wynne, S.A.; Crowther, R.A.; Leslie, A.G. The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. *Mol. Cell* **1999**, *3*, 771–780. [CrossRef]
25. Rost, M.; Mann, S.; Lambert, C.; Doring, T.; Thome, N.; Prange, R. Gamma-adaptin, a novel ubiquitin-interacting adaptor, and Nedd4 ubiquitin ligase control hepatitis B virus maturation. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 29297–29308. [CrossRef]
26. Fujii, K.; Hurley, J.H.; Freed, E.O. Beyond Tsg101: The role of Alix in 'ESCRTing' HIV-1. *Nat. Rev.* **2007**, *5*, 912–916. [CrossRef]
27. Bottcher, B.; Wynne, S.A.; Crowther, R.A. Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. *Nature* **1997**, *386*, 88–91. [CrossRef]
28. Conway, J.F.; Cheng, N.; Zlotnick, A.; Wingfield, P.T.; Stahl, S.J.; Steven, A.C. Visualization of a 4-helix bundle in the hepatitis B virus capsid by cryo-electron microscopy. *Nature* **1997**, *386*, 91–94. [CrossRef] [PubMed]
29. Konig, S.; Beterams, G.; Nassal, M. Mapping of homologous interaction sites in the hepatitis B virus core protein. *J. Virol.* **1998**, *72*, 4997–5005. [CrossRef]
30. Koschel, M.; Thomssen, R.; Bruss, V. Extensive mutagenesis of the hepatitis B virus core gene and mapping of mutations that allow capsid formation. *J. Virol.* **1999**, *73*, 2153–2160. [CrossRef]
31. Crowther, R.A.; Kiselev, N.A.; Bottcher, B.; Berriman, J.A.; Borisova, G.P.; Ose, V.; Pumpens, P. Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell* **1994**, *77*, 943–950. [CrossRef]
32. Zlotnick, A.; Cheng, N.; Conway, J.F.; Booy, F.P.; Steven, A.C.; Stahl, S.J.; Wingfield, P.T. Dimorphism of hepatitis B virus capsids is strongly influenced by the C-terminus of the capsid protein. *Biochemistry* **1996**, *35*, 7412–7421. [CrossRef] [PubMed]

33. Bottcher, B.; Nassal, M. Structure of Mutant Hepatitis B Core Protein Capsids with Premature Secretion Phenotype. *J. Mol. Biol.* **2018**, *430*, 4941–4954. [CrossRef] [PubMed]
34. Wang, J.C.; Dhason, M.S.; Zlotnick, A. Structural organization of pregenomic RNA and the carboxy-terminal domain of the capsid protein of hepatitis B virus. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002919. [CrossRef] [PubMed]
35. Koschel, M.; Oed, D.; Gerelsaikhan, T.; Thomssen, R.; Bruss, V. Hepatitis B virus core gene mutations which block nucleocapsid envelopment. *J. Virol.* **2000**, *74*, 1–7. [CrossRef]
36. Ponsel, D.; Bruss, V. Mapping of amino acid side chains on the surface of hepatitis B virus capsids required for envelopment and virion formation. *J. Virol.* **2003**, *77*, 416–422. [CrossRef]
37. Seitz, S.; Urban, S.; Antoni, C.; Böttcher, B. Cryo-electron microscopy of hepatitis B virions reveals variability in envelope capsid interactions. *EMBO J.* **2007**, *26*, 4160–4167. [CrossRef]
38. Pastor, F.; Herrscher, C.; Patient, R.; Moreau, A.; Burlaud-Gaillard, J.; Seigneuret, F.; de Rocquigny, H.; Roingeard, P.; Hourioux, C. Direct interaction between hepatitis B virus core and envelope proteins analyzed in a cellular context. *Sci. Rep.* **2019**, in press. [CrossRef]
39. Ludgate, L.; Liu, K.; Luckenbaugh, L.; Streck, N.; Eng, S.; Voitenleitner, C.; Delaney, W.E.t.; Hu, J. Cell-Free Hepatitis B Virus Capsid Assembly Dependent on the Core Protein C-Terminal Domain and Regulated by Phosphorylation. *J. Virol.* **2016**, *90*, 5830–5844. [CrossRef]
40. Patel, N.; White, S.J.; Thompson, R.F.; Bingham, R.; Weiss, E.U.; Maskell, D.P.; Zlotnick, A.; Dykeman, E.; Tuma, R.; Twarock, R.; et al. HBV RNA pre-genome encodes specific motifs that mediate interactions with the viral core protein that promote nucleocapsid assembly. *Nat. Microbiol.* **2017**, *2*, 17098. [CrossRef]
41. Zlotnick, A.; Porterfield, J.Z.; Wang, J.C. To build a virus on a nucleic acid substrate. *Biophys. J.* **2013**, *104*, 1595–1604. [CrossRef]
42. Heger-Stevic, J.; Zimmermann, P.; Lecoq, L.; Bottcher, B.; Nassal, M. Hepatitis B virus core protein phosphorylation: Identification of the SRPK1 target sites and impact of their occupancy on RNA binding and capsid structure. *PLoS Pathog.* **2018**, *14*, e1007488. [CrossRef] [PubMed]
43. Gazina, E.V.; Fielding, J.E.; Lin, B.; Anderson, D.A. Core protein phosphorylation modulates pregenomic RNA encapsidation to different extents in human and duck hepatitis B viruses. *J. Virol.* **2000**, *74*, 4721–4728. [CrossRef] [PubMed]
44. Beames, B.; Lanford, R.E. Carboxy-terminal truncations of the HBV core protein affect capsid formation and the apparent size of encapsidated HBV RNA. *Virology* **1993**, *194*, 597–607. [CrossRef] [PubMed]
45. Nassal, M. The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly. *J. Virol.* **1992**, *66*, 4107–4116. [CrossRef]
46. Liao, W.; Ou, J.H. Phosphorylation and nuclear localization of the hepatitis B virus core protein: Significance of serine in the three repeated SPRRR motifs. *J. Virol.* **1995**, *69*, 1025–1029. [CrossRef]
47. Lan, Y.T.; Li, J.; Liao, W.; Ou, J. Roles of the three major phosphorylation sites of hepatitis B virus core protein in viral replication. *Virology* **1999**, *259*, 342–348. [CrossRef]
48. Le Pogam, S.; Chua, P.K.; Newman, M.; Shih, C. Exposure of RNA templates and encapsidation of spliced viral RNA are influenced by the arginine-rich domain of human hepatitis B virus core antigen (HBcAg 165–173). *J. Virol.* **2005**, *79*, 1871–1887. [CrossRef]
49. Porterfield, J.Z.; Dhason, M.S.; Loeb, D.D.; Nassal, M.; Stray, S.J.; Zlotnick, A. Full-length hepatitis B virus core protein packages viral and heterologous RNA with similarly high levels of cooperativity. *J. Virol.* **2010**, *84*, 7174–7184. [CrossRef]
50. Jung, J.; Hwang, S.G.; Chwae, Y.J.; Park, S.; Shin, H.J.; Kim, K. Phosphoacceptors threonine 162 and serines 170 and 178 within the carboxyl-terminal RRRS/T motif of the hepatitis B virus core protein make multiple contributions to hepatitis B virus replication. *J. Virol.* **2014**, *88*, 8754–8767. [CrossRef]
51. Diab, A.; Foca, A.; Fusil, F.; Lahlali, T.; Jalaguier, P.; Amirache, F.; N'Guyen, L.; Isorce, N.; Cosset, F.L.; Zoulim, F.; et al. Polo-like-kinase 1 is a proviral host factor for hepatitis B virus replication. *Hepatology* **2017**, *66*, 1750–1765. [CrossRef] [PubMed]
52. Luo, J.; Xi, J.; Gao, L.; Hu, J. Role of Hepatitis B virus capsid phosphorylation in nucleocapsid disassembly and covalently closed circular DNA formation. *PLoS Pathog.* **2020**, *16*, e1008459. [CrossRef] [PubMed]
53. Su, P.Y.; Yang, C.J.; Chu, T.H.; Chang, C.H.; Chiang, C.; Tang, F.M.; Lee, C.Y.; Shih, C. HBV maintains electrostatic homeostasis by modulating negative charges from phosphoserine and encapsidated nucleic acids. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 38959. [CrossRef] [PubMed]

54. Wojciechowski, M.; Grycuk, T.; Antosiewicz, J.M.; Lesyng, B. Prediction of secondary ionization of the phosphate group in phosphotyrosine peptides. *Biophys. J.* **2003**, *84*, 750–756. [CrossRef]
55. Daub, H.; Blencke, S.; Habenberger, P.; Kurtenbach, A.; Dennenmoser, J.; Wissing, J.; Ullrich, A.; Cotten, M. Identification of SRPK1 and SRPK2 as the major cellular protein kinases phosphorylating hepatitis B virus core protein. *J. Virol.* **2002**, *76*, 8124–8137. [CrossRef]
56. Chen, C.; Wang, J.C.; Zlotnick, A. A kinase chaperones hepatitis B virus capsid assembly and captures capsid dynamics in vitro. *PLoS Pathog.* **2011**, *7*, e1002388. [CrossRef]
57. Wittkop, L.; Schwarz, A.; Cassany, A.; Grun-Bernhard, S.; Delaleau, M.; Rabe, B.; Cazenave, C.; Gerlich, W.; Glebe, D.; Kann, M. Inhibition of protein kinase C phosphorylation of hepatitis B virus capsids inhibits virion formation and causes intracellular capsid accumulation. *Cell Microbiol.* **2010**, *12*, 962–975. [CrossRef]
58. Ludgate, L.; Ning, X.; Nguyen, D.H.; Adams, C.; Mentzer, L.; Hu, J. Cyclin-dependent kinase 2 phosphorylates s/t-p sites in the hepadnavirus core protein C-terminal domain and is incorporated into viral capsids. *J. Virol.* **2012**, *86*, 12237–12250. [CrossRef]
59. Manning, G.; Whyte, D.B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* **2002**, *298*, 1912–1934. [CrossRef]
60. Yeh, C.T.; Wong, S.W.; Fung, Y.K.; Ou, J.H. Cell cycle regulation of nuclear localization of hepatitis B virus core protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 6459–6463. [CrossRef]
61. Klumpp, K.; Lam, A.M.; Lukacs, C.; Vogel, R.; Ren, S.; Espiritu, C.; Baydo, R.; Atkins, K.; Abendroth, J.; Liao, G.; et al. High-resolution crystal structure of a hepatitis B virus replication inhibitor bound to the viral core protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 15196–15201. [CrossRef]
62. Zhao, Q.; Hu, Z.; Cheng, J.; Wu, S.; Luo, Y.; Chang, J.; Hu, J.; Guo, J.T. Hepatitis B Virus Core Protein Dephosphorylation Occurs during Pregenomic RNA Encapsidation. *J. Virol.* **2018**, *92*. [CrossRef] [PubMed]
63. Katen, S.; Zlotnick, A. The thermodynamics of virus capsid assembly. *Methods Enzym.* **2009**, *455*, 395–417. [CrossRef]
64. Selzer, L.; Kant, R.; Wang, J.C.; Bothner, B.; Zlotnick, A. Hepatitis B Virus Core Protein Phosphorylation Sites Affect Capsid Stability and Transient Exposure of the C-terminal Domain. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 28584–28593. [CrossRef] [PubMed]
65. Gallina, A.; Bonelli, F.; Zentilin, L.; Rindi, G.; Muttini, M.; Milanesi, G. A recombinant hepatitis B core antigen polypeptide with the protamine-like domain deleted self-assembles into capsid particles but fails to bind nucleic acids. *J. Virol.* **1989**, *63*, 4645–4652. [CrossRef]
66. Petit, M.A.; Pillot, J. HBc and HBe antigenicity and DNA-binding activity of major core protein P22 in hepatitis B virus core particles isolated from the cytoplasm of human liver cells. *J. Virol.* **1985**, *53*, 543–551. [CrossRef] [PubMed]
67. Birnbaum, F.; Nassal, M. Hepatitis B virus nucleocapsid assembly: Primary structure requirements in the core protein. *J. Virol.* **1990**, *64*, 3319–3330. [CrossRef]
68. Hudson, W.H.; Ortlund, E.A. The structure, function and evolution of proteins that bind DNA and RNA. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 749–760. [CrossRef]
69. Nassal, M.; Leifer, I.; Wingert, I.; Dallmeier, K.; Prinz, S.; Vorreiter, J. A Structural Model for Duck Hepatitis B Virus Core Protein Derived by Extensive Mutagenesis. *J. Virol.* **2007**, *81*, 13218–13229. [CrossRef]
70. Hatton, T.; Zhou, S.; Standring, D.N. RNA- and DNA-binding activities in hepatitis B virus capsid protein: A model for their roles in viral replication. *J. Virol.* **1992**, *66*, 5232–5241. [CrossRef]
71. Kock, J.; Nassal, M.; Deres, K.; Blum, H.E.; von Weizsacker, F. Hepatitis B virus nucleocapsids formed by carboxy-terminally mutated core proteins contain spliced viral genomes but lack full-size DNA. *J. Virol.* **2004**, *78*, 13812–13818. [CrossRef] [PubMed]
72. Lewellyn, E.B.; Loeb, D.D. The arginine clusters of the carboxy-terminal domain of the core protein of hepatitis B virus make pleiotropic contributions to genome replication. *J. Virol.* **2011**, *85*, 1298–1309. [CrossRef] [PubMed]
73. Schroeder, R.; Barta, A.; Semrad, K. Strategies for RNA folding and assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 908–919. [CrossRef]
74. Rajkowitsch, L.; Chen, D.; Stampfl, S.; Semrad, K.; Waldsich, C.; Mayer, O.; Jantsch, M.F.; Konrat, R.; Blasi, U.; Schroeder, R. RNA chaperones, RNA annealers and RNA helicases. *RNA Biol.* **2007**, *4*, 118–130. [CrossRef] [PubMed]

75. Herschlag, D. RNA chaperones and the RNA folding problem. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 20871–20874. [CrossRef] [PubMed]
76. Godet, J.; Mely, Y. Biophysical studies of the nucleic acid chaperone properties of the HIV-1 nucleocapsid protein. *RNA Biol.* **2010**, *7*, 687–699. [CrossRef] [PubMed]
77. Cristofari, G.; Darlix, J.L. The ubiquitous nature of RNA chaperone proteins. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **2002**, *72*, 223–268.
78. Tompa, P.; Csermely, P. The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones. *FASEB J.* **2004**, *18*, 1169–1175. [CrossRef]
79. Chu, T.H.; Liou, A.T.; Su, P.Y.; Wu, H.N.; Shih, C. Nucleic acid chaperone activity associated with the arginine-rich domain of human hepatitis B virus core protein. *J. Virol.* **2014**, *88*, 2530–2543. [CrossRef]
80. Karn, J. The molecular biology of HIV latency: Breaking and restoring the Tat-dependent transcriptional circuit. *Curr. Opin. HIV AIDS* **2011**, *6*, 4–11. [CrossRef]
81. Darlix, J.L.; de Rocquigny, H.; Mauffret, O.; Mely, Y. Retrospective on the all-in-one retroviral nucleocapsid protein. *Virus Res.* **2014**, *193*, 2–15. [CrossRef] [PubMed]
82. Rein, A.; Datta, S.A.; Jones, C.P.; Musier-Forsyth, K. Diverse interactions of retroviral Gag proteins with RNAs. *Trends Biochem. Sci.* **2011**, *36*, 373–380. [CrossRef] [PubMed]
83. Wu, H.; Mitra, M.; Naufer, M.N.; McCauley, M.J.; Gorelick, R.J.; Rouzina, I.; Musier-Forsyth, K.; Williams, M.C. Differential contribution of basic residues to HIV-1 nucleocapsid protein's nucleic acid chaperone function and retroviral replication. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 2525–2537. [CrossRef] [PubMed]
84. Machida, A.; Ohnuma, H.; Tsuda, F.; Yoshikawa, A.; Hoshi, Y.; Tanaka, T.; Kishimoto, S.; Akahane, Y.; Miyakawa, Y.; Mayumi, M. Phosphorylation in the carboxyl-terminal domain of the capsid protein of hepatitis B virus: Evaluation with a monoclonal antibody. *J. Virol.* **1991**, *65*, 6024–6030. [CrossRef]
85. Dhason, M.S.; Wang, J.C.; Hagan, M.F.; Zlotnick, A. Differential assembly of Hepatitis B Virus core protein on single- and double-stranded nucleic acid suggest the dsDNA-filled core is spring-loaded. *Virology* **2012**, *430*, 20–29. [CrossRef]
86. Bock, C.T.; Schwinn, S.; Locarnini, S.; Fyfe, J.; Manns, M.P.; Trautwein, C.; Zentgraf, H. Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome. *J. Mol. Biol.* **2001**, *307*, 183–196. [CrossRef]
87. Pollicino, T.; Belloni, L.; Raffa, G.; Pediconi, N.; Squadrito, G.; Raimondo, G.; Levrero, M. Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones. *Gastroenterology* **2006**, *130*, 823–837. [CrossRef]
88. Chong, C.K.; Cheng, C.Y.S.; Tsoi, S.Y.J.; Huang, F.Y.; Liu, F.; Seto, W.K.; Lai, C.L.; Yuen, M.F.; Wong, D.K. Role of hepatitis B core protein in HBV transcription and recruitment of histone acetyltransferases to cccDNA minichromosome. *Antivir. Res.* **2017**, *144*, 1–7. [CrossRef]
89. Lott, L.; Beames, B.; Notvall, L.; Lanford, R.E. Interaction between hepatitis B virus core protein and reverse transcriptase. *J. Virol.* **2000**, *74*, 11479–11489. [CrossRef]
90. Macdonald, P.; Johnson, J.; Smith, E.; Chen, Y.; Mueller, J.D. Brightness analysis. *Methods Enzym.* **2013**, *518*, 71–98. [CrossRef]
91. Melegari, M.; Wolf, S.K.; Schneider, R.J. Hepatitis B virus DNA replication is coordinated by core protein serine phosphorylation and HBx expression. *J. Virol.* **2005**, *79*, 9810–9820. [CrossRef] [PubMed]
92. Yeh, C.T.; Ou, J.H. Phosphorylation of hepatitis B virus precore and core proteins. *J. Virol.* **1991**, *65*, 2327–2331. [CrossRef] [PubMed]
93. Pugh, J.; Zweidler, A.; Summers, J. Characterization of the major duck hepatitis B virus core particle protein. *J. Virol.* **1989**, *63*, 1371–1376. [CrossRef] [PubMed]
94. Rabe, B.; Vlachou, A.; Pante, N.; Helenius, A.; Kann, M. Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 9849–9854. [CrossRef] [PubMed]
95. Perlman, D.H.; Berg, E.A.; O'Connor, P.B.; Costello, C.E.; Hu, J. Reverse transcription-associated dephosphorylation of hepadnavirus nucleocapsids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 9020–9025. [CrossRef]
96. Ning, X.; Basagoudanavar, S.H.; Liu, K.; Luckenbaugh, L.; Wei, D.; Wang, C.; Wei, B.; Zhao, Y.; Yan, T.; Delaney, W.; et al. Capsid Phosphorylation State and Hepadnavirus Virion Secretion. *J. Virol.* **2017**, *91*. [CrossRef]
97. Basagoudanavar, S.H.; Perlman, D.H.; Hu, J. Regulation of hepadnavirus reverse transcription by dynamic nucleocapsid phosphorylation. *J. Virol.* **2007**, *81*, 1641–1649. [CrossRef]

98. Schlicht, H.J.; Bartenschlager, R.; Schaller, H. The duck hepatitis B virus core protein contains a highly phosphorylated C terminus that is essential for replication but not for RNA packaging. *J. Virol.* **1989**, *63*, 2995–3000. [CrossRef]
99. Matsuda, K.; Satoh, S.; Ohori, H. DNA-binding activity of hepatitis B e antigen polypeptide lacking the protaminelike sequence of nucleocapsid protein of human hepatitis B virus. *J. Virol.* **1988**, *62*, 3517–3521. [CrossRef]
100. Zhou, S.; Yang, S.Q.; Standring, D.N. Characterization of hepatitis B virus capsid particle assembly in Xenopus oocytes. *J. Virol.* **1992**, *66*, 3086–3092. [CrossRef] [PubMed]
101. Standring, D.N.; Ou, J.H.; Masiarz, F.R.; Rutter, W.J. A signal peptide encoded within the precore region of hepatitis B virus directs the secretion of a heterogeneous population of e antigens in Xenopus oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 8405–8409. [CrossRef]
102. Seifer, M.; Standring, D.N. A protease-sensitive hinge linking the two domains of the hepatitis B virus core protein is exposed on the viral capsid surface. *J. Virol.* **1994**, *68*, 5548–5555. [CrossRef] [PubMed]
103. Zlotnick, A.; Cheng, N.; Stahl, S.J.; Conway, J.F.; Steven, A.C.; Wingfield, P.T. Localization of the C terminus of the assembly domain of hepatitis B virus capsid protein: Implications for morphogenesis and organization of encapsidated RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 9556–9561. [CrossRef] [PubMed]
104. Vogel, M.; Diez, M.; Eisfeld, J.; Nassal, M. In vitro assembly of mosaic hepatitis B virus capsid-like particles (CLPs): Rescue into CLPs of assembly-deficient core protein fusions and FRET-suited CLPs. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 5211–5216. [CrossRef]
105. Kann, M.; Sodeik, B.; Vlachou, A.; Gerlich, W.H.; Helenius, A. Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* **1999**, *145*, 45–55. [CrossRef]
106. Li, H.C.; Huang, E.Y.; Su, P.Y.; Wu, S.Y.; Yang, C.C.; Lin, Y.S.; Chang, W.C.; Shih, C. Nuclear export and import of human hepatitis B virus capsid protein and particles. *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, e1001162. [CrossRef] [PubMed]
107. Blondot, M.L.; Bruss, V.; Kann, M. Intracellular transport and egress of hepatitis B virus. *J. Hepatol.* **2016**, *64*, S49–S59. [CrossRef] [PubMed]
108. Yu, X.; Jin, L.; Jih, J.; Shih, C.; Zhou, Z.H. 3.5A cryoEM structure of hepatitis B virus core assembled from full-length core protein. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e69729. [CrossRef]
109. Ning, X.; Luckenbaugh, L.; Liu, K.; Bruss, V.; Sureau, C.; Hu, J. Common and Distinct Capsid and Surface Protein Requirements for Secretion of Complete and Genome-Free Hepatitis B Virions. *J. Virol.* **2018**, *92*. [CrossRef]
110. Watts, N.R.; Conway, J.F.; Cheng, N.; Stahl, S.J.; Belnap, D.M.; Steven, A.C.; Wingfield, P.T. The morphogenic linker peptide of HBV capsid protein forms a mobile array on the interior surface. *EMBO J.* **2002**, *21*, 876–884. [CrossRef]
111. Ceres, P.; Zlotnick, A. Weak protein-protein interactions are sufficient to drive assembly of hepatitis B virus capsids. *Biochemistry* **2002**, *41*, 11525–11531. [CrossRef]
112. Albin, C.; Robinson, W.S. Protein kinase activity in hepatitis B virus. *J. Virol.* **1980**, *34*, 297–302. [CrossRef] [PubMed]
113. Jeng, K.S.; Hu, C.P.; Chang, C. Hepatitis B core antigen forms oligomers and complexes with the p gene product in hepatitis B virus core particles. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **1993**, *8*, S114–S118. [CrossRef]
114. Bartenschlager, R.; Schaller, H. Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. *EMBO J.* **1992**, *11*, 3413–3420. [CrossRef] [PubMed]
115. Hu, J.; Lin, L. RNA-protein interactions in hepadnavirus reverse transcription. *Front. Biosci.* **2009**, *14*, 1606–1618. [CrossRef]
116. Wang, J.C.; Nickens, D.G.; Lentz, T.B.; Loeb, D.D.; Zlotnick, A. Encapsidated hepatitis B virus reverse transcriptase is poised on an ordered RNA lattice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 11329–11334. [CrossRef]
117. Rabe, B.; Delaleau, M.; Bischof, A.; Foss, M.; Sominskaya, I.; Pumpens, P.; Cazenave, C.; Castroviejo, M.; Kann, M. Nuclear entry of hepatitis B virus capsids involves disintegration to protein dimers followed by nuclear reassociation to capsids. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*, e1000563. [CrossRef]
118. Chen, C.; Wang, J.C.; Pierson, E.E.; Keifer, D.Z.; Delaleau, M.; Gallucci, L.; Cazenave, C.; Kann, M.; Jarrold, M.F.; Zlotnick, A. Importin beta Can Bind Hepatitis B Virus Core Protein and Empty Core-Like Particles and Induce Structural Changes. *PLoS Pathog.* **2016**, *12*, e1005802. [CrossRef]



© 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/).

Virgile RAT

Analyse de la capside du VHB dans la morphogenèse virale : Etude de sa formation, de son trafic intracellulaire et de son rôle dans la reconnaissance de Pol et de l'ARN

Résumé :

Le virus de l'Hépatite B est un virus hépatotrope qui fait partie des enjeux actuels de santé publique. Ce virus est constitué d'une capside essentiellement formée par la protéine HBc ou Core. Cette protéine est donc une des cibles privilégiées pour le développement de molécules douées d'activité antivirale pouvant renforcer l'arsenal thérapeutique actuel. Il est par conséquent important de participer à l'approfondissement des connaissances sur la core et notamment son assemblage en milieu cellulaire. Les études *in vitro* ont permis de décrire les principales caractéristiques de cette protéine via des protéines cores produites chez E.coli. Dans ces modèles, le domaine N-terminal est essentiel et suffisant pour l'assemblage de la capside. Cependant, très peu de données existent sur cet assemblage dans des cellules de mammifères compétentes pour la réplication d'HBV. Les objectifs de ces travaux ont été de suivre l'assemblage, la localisation et le recrutement des partenaires viraux de la core par microscopie optique quantitative (FLIM, FCS) et microscopie électronique. Nous avons pu observer un assemblage rapide de la protéine core à une concentration submicromolaire, ce qui traduit une forte affinité. Nous avons également pu montrer par délétions ou mutations ponctuelles les rôles essentiels de domaines et d'acides aminés tels que le domaine C-terminal ou l'acide aminé Y132. Nous avons également cherché à suivre l'interaction core-ARN. Enfin ces travaux ont une application directe avec l'étude et la caractérisation d'antiviraux à action directe de différentes familles. La première classe montre la formation de matériaux amorphes accompagnés de structures cristallines tandis que la seconde classe n'aurait pas d'effet sur la structure mais altère le trafic intracellulaire de la capside.

Mots clés : Virus de l'hépatite B, morphogenèse virale, assemblage, inhibiteurs, microscopie

Abstract :

The hepatitis B virus is a hepatotropic virus that is currently a public health issue. This virus consists of a capsid essentially formed by the HBc or Core protein. This protein is thus one of the privileged targets for the development of molecules with antiviral activity that can reinforce the current therapeutic arsenal. It is therefore important to participate in the furthering of knowledge on the core and particularly its assembly in the cellular environment. In vitro studies have allowed us to describe the main characteristics of this protein via core proteins produced in E.coli. In these models, the N-terminal domain is essential and sufficient for capsid assembly. However, very few data exist on this assembly in mammalian cells competent for HBV replication. The objectives of this work were to follow the assembly, localisation and recruitment of the viral partners of the core by quantitative optic microscopy (FLIM, FCS) and electron microscopy. We were able to observe a fast assembly of the core protein at a submicromolar concentration, which reflects a high affinity. We were also able to show by deletions or point mutations the essential roles of domains and amino acids such as the C-terminal domain or the amino acid Y132. We also sought to follow the core-RNA interaction. Finally, this work has a direct application with the study and characterisation of direct-acting antivirals of different families. The first class show the formation of amorphous materials accompanied by crystalline structures while the second class would have no effect on the structure but alters the intracellular traffic of the capsid.

Keywords : Hepatitis B virus, viral morphogenesis, assembly, inhibitors, microscopy