► Le virus de l'hépatite delta, aussi appelé virus de l'hépatite D ou HDV, est un agent viral déficient à ARN de polarité négative. Il se réplique dans les cellules de mammifère et infecte l'homme. Son génome est un petit ARN circulaire monocaténaire d'environ 1 680 nucléotides. Pour se propager, HDV a cependant besoin d'un autre virus, le virus de l'hépatite B (HBV), qui lui fournit les protéines d'enveloppe nécessaires à l'assemblage de ses virions et à la propagation de l'infection. Les manifestations cliniques graves de l'infection combinée HBV-HDV vont des formes aiguës d'hépatites fulminantes aux formes chroniques de fibroses du foie (cirrhose), qui peuvent conduire à un carcinome hépatocellulaire. Une originalité de l'HDV repose sur la ressemblance de son génome avec celui des viroïdes, des agents infectieux des plantes constitués de petits ARN circulaires non encapsidés. Dépourvu de toute activité réplicase virale, l'HDV doit utiliser l'activité ARN polymérase-ADN dépendante de la cellule qu'il infecte pour répliquer son ARN génomique. Comment dès lors, cette répllication se réalise ? Nous abordons dans cette revue les principales étapes de la transcription et de la répllication de ces ARN viraux. ◀

Un peu d'histoire

En décembre 2017 a été célébré le 40^e anniversaire de la publication de Mario Rizzetto et ses collègues dans la revue *Gut* rapportant la découverte du virus HDV chez l'homme [1]. Ces premières contributions englobaient la découverte d'un antigène viral inconnu et la caractérisation d'un agent infectieux déficient, satellite du virus de l'hépatite B (HBV). Rizzetto et ses collègues identifièrent en effet un nouveau complexe antigène-anticorps. Il l'appela « delta » parce que, d'une part, les noms A, B et non A-non B étaient déjà utilisés pour les autres hépatites, et parce que, d'autre part, le profil de marquage par immunofluorescence des cellules infectées qu'il avait mis en évidence était distinct et indépendant de celui obtenu avec les autres virus (AgHBs, à

Répllication du génome du virus de l'hépatite delta :

Un rôle pour la petite protéine delta S-HDAg

Natali Abeywickrama-Samarakoon¹,
Jean-Claude Cortay¹, Camille Sureau²,
Dulce Alfaiate³, Massimo Levrero^{1,4}, Paul Dénay^{1,5}

la protéine de surface du virus ; AgHBe, protéine d'export du virus ; et AgHBc, protéine de capsid). Le virus HDV a en fait été découvert 14 ans après l'antigène *Australia* par B. Blumberg, et 7 ans après la découverte par DS Dane du virus de l'hépatite B, à un moment où de nombreux sous-types d'HBV étaient

décrits. L'hypothèse d'un variant d'HBV avait alors été posée, mais HDV s'est définitivement individualisé du virus de l'hépatite B quand Rizzetto et ses collègues ont découvert, grâce à des expériences de transmissions réalisées chez le chimpanzé, un ARN de petite taille qui était associé à l'AgHBs de HBV et à l'antigène HDAg de HDV [2]. Dès lors, l'HDV s'est imposé dans le monde des virus des hépatites comme un nouveau et unique virus humain à ARN, satellite obligatoire de l'HBV.

Dans cette revue, nous décrivons certaines étapes de la répllication de l'ARN du virus HDV. Les étapes qui ne sont pas directement liées à sa répllication (adsorption, pénétration, édition, hydrolyse par le ribozyme, isoprénnylation, assemblage et sortie), ainsi que l'épidémiologie de l'infection, son diagnostic et son traitement, ont été précisément détaillés au travers de revues [3-6].

Structure du virion de HDV

Le virion de HDV est constitué d'une enveloppe dans laquelle s'ancrent les protéines d'enveloppe du virus auxiliaire HBV et d'une ribonucléo-

¹ Inserm, U1052 – UMR CNRS 5286, Centre de recherche en cancérologie de Lyon, Lyon, France

² Laboratoire de virologie moléculaire, Inserm UMR S_1134, Institut National de Transfusion Sanguine, Paris, France

³ Département de pathologie et immunologie, université de Genève, Suisse

⁴ Service d'hépatogastroentérologie, Hôpital de la Croix Rousse, université Lyon-I, France

⁵ Laboratoire de microbiologie clinique, groupe des Hôpitaux universitaires de Paris-Seine Saint Denis, UFR santé médecine, biologie humaine, université Paris 13, Bobigny, France
paul.deny@inserm.fr

Figure 1. La particule virale HDV infectieuse est une particule chimérique entre des composants externes fournis par le virus de l'hépatite B auxiliaire et des composants internes propres. Au sein de l'enveloppe membranaire sont ancrées les protéines et glycoprotéines de surface du virus HBV (AgHBs). La grande protéine L-AgHBs est indispensable pour que la particule soit infectieuse. La ribonucléoprotéine HDV interne n'a pas la solidité classique des capsides virales. Elle est composée de polymères des deux formes de protéines delta associées à l'ARN viral génomique circulaire sous forme pseudo-double brin, alternant des zones parfaitement appariées et des petites boucles conférant à la molécule d'ARN une certaine flexibilité. Pour que la particule soit infectieuse, il faut que le génome code la petite protéine delta indispensable à la réplication, bien que dépourvue d'activité polymérase.

protéine (ou RNP) comprenant les composants spécifiques du virus delta : son ARN génomique circulaire, de petite taille et de polarité négative, associé aux protéines présentant l'antigène delta (ou HDAG) dont il existe deux isoformes, la petite protéine (S-HDAG) et la grande (L-HDAG). Le nombre exact de protéines codées par génome, le ratio entre L-HDAG et S-HDAG, ainsi que la configuration exacte de la RNP ne sont pas connus (Figure 1).

Les enveloppes de l'HDV dérivent des AgHBs de l'HBV

En l'absence du virus HBV, la réplication de HDV dans des cellules de mammifères aboutit à la formation de ribonucléoprotéines (RNP), mais aucune ribonucléoprotéine n'est décelable dans le milieu de culture, malgré une accumulation des ARN du virus dans la cellule. Les RNP d'HDV isolées ne peuvent en effet bourgeonner et sortir de la cellule. En revanche, en présence des protéines d'enveloppe d'HBV (en l'occurrence AgHBs), elles rejoignent l'ergastoplasme où bourgeonnent les AgHBs qui, en enveloppant la RNP, libèrent le virion HDV des cellules hôtes [7]. L'enveloppe de la particule d'HDV est constituée de 95 % de S-AgHBs, de 0 à 5 % de M-AgHBs et de 1 % de L-AgHBs. Ces proportions sont différentes de celles de l'enveloppe d'HBV [8]. Il est possible d'envelopper la RNP d'HDV par la protéine S-AgHBs et former des particules qui seront non infectieuses, en raison de l'absence de L-AgHBs [9]. Il faut donc, pour la production de virions HDV, que la cellule soit infectée par les 2 virus. La petite glycoprotéine S-AgHBs et la grande protéine L-AgHBs sont en fait indispensables à l'assemblage des virions HDV et à leur entrée

dans la cellule. Ces protéines interagissent en effet avec des glycanes (de type sulfates d'héparane) et avec le récepteur polypeptidique co-transporteur du sodium taurocholate humain (hNTCP) [3, 4, 10]. Le rôle de la grande protéine d'enveloppe d'HBV dans le caractère infectieux d'HDV (mais aussi d'HBV) a été montré [11]. L'adsorption et la pénétration des virus reposent en partie sur le domaine N-terminal (acides aminés 2 à 48) de la protéine L-AgHBs et dépend de son acylation par un acide myristique. Ainsi, l'utilisation de peptides synthétiques mimétiques du domaine N-terminal de L-AgHBs empêche l'infection par HDV et par HBV *in vitro* et *in vivo* [11,12]. Ces peptides sont proposés en thérapeutique contre l'infection par HDV [4].

La ribonucléoprotéine d'HDV

La ribonucléoprotéine d'HDV (RNP HDV) est constituée de l'ARN génomique circulaire du virus, sous forme pseudo bicaténaire, sur lequel seraient fixées environ 50 à 70 isoformes de la protéine HDAG [13]. Analysée par centrifugation en gradient de densité, la RNP semble stable, bien que son antigénicité disparaisse à de faibles concentrations de dodécylsulfate de sodium (SDS), un détergeant ionique. L'analyse en microscopie électronique de la RNP d'HDV révèle une structure sphérique d'environ 19 nm de diamètre. Le signal de localisation nucléaire (ou NLS) de S-HDAG, accessible à la surface de la RNP [14, 15], permet la translocation de la protéine vers le noyau. On ne sait si L-HDAG est encore présente dans la RNP lors de la transcription des différents ARN d'HDV. La cristallisation d'un peptide structuré de la protéine suggère une polymérisation en octamère des protéines delta [16]. Cette organisation a été discutée [13] et une région pseudo bicaténaire, de 299 à 311 nucléotides, serait nécessaire pour fixer un octamère de protéines HDAG.

Le processus de transcription-réplication du génome d'HDV ne peut donc se produire qu'en présence d'ARN-G (ARN génomique) complexé à S-HDAG [17]. La quantité de S-HDAG dans la RNP d'HDV, qui entre lors de l'infection des cellules, serait ainsi suffisante pour initier la réplication de l'ARN viral.

Le génome de l'HDV dans sa ribonucléoprotéine

Le génome d'HDV est un petit ARN de polarité négative composé d'approximativement 1 680 nucléotides ; cette longueur varie selon les huit génotypes viraux (entre 1 668 et 1 697 nucléotides) [18]. Le génome ARN monocaténaire circulaire du virus se structure en ARN quasi-bicaténaire, en raison d'une complémentarité des bases (de 74 %) associée à un taux de guanine-cytosine de 60 %. L'ARN d'HDV est ainsi décrit comme une tige

Figure 2. Représentation schématique en 12 étapes de la réplication du virus de l'hépatite delta dans l'hépatocyte, que l'on peut résumer par une réplication intra-nucléaire d'un virus ARN de polarité négative. Pour la clarté du schéma, la réplication de l'HBV n'est pas représentée. Seul le bourgeonnement de l'AgHBs apparaît en rouge. L'entrée virale suivrait les mêmes processus que celle du virus de l'hépatite B. Le virus de l'hépatite delta ne codant aucune protéine à activité réplacase, la réplication du génome et sa transcription reposeront sur des enzymes cellulaires dont l'ARN polymérase de type II. La sortie virale dépendra de signaux d'export nucléaire de la grande (large) protéine L-HDAg, de l'isoprénnylation conférant une orientation membranaire de la RNP et surtout du bourgeonnement spontané des antigènes HBs du virus HBV auxiliaire dans les voies de sécrétion de la cellule.

non ramifiée qui associe des régions parfaitement bicaténaires à de petites protubérances et des boucles internes, lui conférant une configuration flexible [14].

Cycle viral de l'HDV

De façon très schématique, le cycle viral de l'HDV peut être décrit en 12 étapes (Figure 2). Après sa pénétration dans l'hépatocyte, la RNP migre vers le noyau grâce au NLS des protéines HDAGs qui lui sont associées. La réplication, durant laquelle trois ARN viraux sont décelés, est alors déclenchée. Il s'agit (1) du génome circulaire (ou ARN-G), (2) de son exact complément antiparallèle et circulaire, appelé antigénome (ARN-AG), et (3) d'un ARN messager linéaire polyadénylé codant la/les protéine(s) delta (HDAg-mRNA) (Figure 3) [19]. Ces différents ARN sont synthétisés à partir de matrices ARN circulaires pseudo-bicaténaires. Si HDV ne possède pas d'activité réplacase intrinsèque,

la petite protéine delta S-HDAg est indispensable à la réplication. La grande protéine L-HDAg, exprimée plus tardivement lors du cycle viral, est impliquée dans l'assemblage des virions. La réplication des ARN génomique et antigénomique produit des molécules linéaires contenant plusieurs copies répétées d'ARN-G ou d'ARN-AG par un mécanisme de cercle roulant d'ARN. Ces molécules comprennent chacune une séquence nucléotidique ribozyme. Elles présentent donc une activité d'autoclivage qui hydrolyse les ARN linéaires néo-synthétisés en monomères, qui sont eux-mêmes circularisés de façon covalente, probablement par une ligase cellulaire.

Un seul gène porté par l'ARN HDV de polarité antigénomique code les deux isoformes de la protéine qui sont successivement synthétisées pendant le cycle viral :

Figure 3. Les différents ARN HDV dans la cellule hépatique. **A)** le génome dans sa forme simple brin circulaire pseudo-bicaténaire ou 70 % des ribonucléotides s'apparient entre eux pour former une structure linéaire non branchée. **B)** L'antigénome, complémentaire strict du génome, possède le cadre ouvert de lecture (ORF) codant les 2 isoformes de la protéine delta (S-HDAg et L-HDAg). C'est sur cette molécule AG que survient l'édition du codon stop de l'ORF S-HDAg. Le rectangle rouge représente la petite phase 3' supplé-

mentaire de L-HDAg après l'édition du codon stop (UAG) en codon 196 tryptophane (UGG). **C)** l'ARN messenger codant initialement la petite protéine S-HDAg puis, après édition, la grande protéine L-HDAg qui comprend toute la phase codante de la petite protéine S-HDAg ainsi que la traduction de la petite phase codante représentée en rouge. **D)** L'ARN viral dans le sérum (puits 1) ou dans le foie (puits 2 et 3) de marmottes infectées expérimentalement détecté en *northern blot* après hybridation. Les tailles de l'ARNm (0,8 Kb), du monomère (1,7 Kb), du dimère (3,4 Kb) et du trimère (5,1 Kb) sont indiquées sur la gauche. **E)** Cinétique de la réplication virale dans des cultures de cellules HepaRG différenciées.

S-HDAg de 194 ou 195 acides aminés (soit environ 24 kDa) et L-HDAg de 213, 214 ou 215 acides aminés (soit environ 27 kDa). La différence entre les deux isoformes est une extension de 19 ou 20 acides aminés en C-terminal de la protéine L-HDAg. Pour S-HDAg, le cadre de lecture se termine par un codon non-sens UAG, en position 196. S-HDAg est produite dans la phase précoce du cycle viral. Pour générer L-HDAg, le brin antigénome (AG) circulaire est édité par l'adénosine déaminase cellulaire (ADAR-1). Il agit sur l'ARN double brin à la position du codon stop UAG du gène de S-HDAg, le transformant en codon tryptophane UGG [20]. L'antigénome édité est alors recopié par l'ARN polymérase II ADN-dépendante (Pol II) pour produire un génome HDV qui sera transcrit en ARN messenger tardif codant la L-HDAg. L'édition et la production de L-HDAg surviennent pendant la seconde phase de la réplication du HDV (qui apparaît après le 3^e jour en culture des cellules infectées) (Figure 3). L'édition d'ARN, suivie de la production de la L-HDAg, entraîne un état d'équilibre entre réplication du génome et assemblage des particules virales. Le transport nucléo-cytoplasmique des RNP assemblées dépend de la L-HDAg qui, outre le signal d'export nucléaire [3], interagit avec les protéines TAP/NXF1 (*mRNA export transport receptor*) et Aly/REF (*export adaptor mRNA-binding protein*) au niveau du complexe d'export nucléaire TREX (*transcription-export complex*) [21]. Dans le cytoplasme, les RNP sont farnésylées au niveau d'un motif CXXX présent à l'extrémité C-terminale des L-HDAg, et associées alors aux membranes de l'ergastoplasme. À ce niveau, elles

interagissent avec le domaine C-terminal intra-cytoplasmique des protéines d'enveloppe de l'HBV, en particulier avec une région riche en résidus tryptophane (le domaine matrice). Cette interaction conduit au bourgeonnement des virions d'HDV, vraisemblablement par la même voie de sécrétion constitutive qu'empruntent les particules sous-virales d'HBV [3].

Transcription et réplication des ARN d'HDV

La synthèse des 3 ARN d'HDV se produit dans différents compartiments nucléaires. Elle implique plusieurs activités polymérases de la cellule (Figure 2). Nucléole, corps d'épissage nucléaires mouchetés et composants de petites structures inter-chromatiniennes irrégulières (*paraspeckles*) pourraient ainsi moduler la réplication des ARN viraux [22]. Dans une première étape, Pol II utilise le génome d'HDV comme matrice afin de synthétiser l'ARN messenger (ARNm) codant la petite protéine S-HDAg [23]. Cet ARNm, coiffé et polyadénylé, est traduit dans le cytoplasme en protéine S-HDAg qui migre vers le noyau et active la réplication du virus. L'ARN-AG serait ensuite synthétisé dans le nucléole, à partir de l'ARN-G, soit par Pol II [23], soit par Pol I ou Pol III

[24]. De nouvelles copies d'ARN-G seront alors synthétisées dans le nucléoplasme par la Pol II.

Transcription de l'ARN messager de HDAG par la Pol II

L'ARN-G constitue la matrice de la synthèse d'ARNm codant l'HDAG dans le nucléoplasme. Environ 1 000 copies d'ARNm, de 800 nucléotides, s'accumulent dans la cellule [19]. Le cadre de lecture ouvert du gène delta est porté par l'ARN AG (Figure 3). L'ARNm delta présente une structure similaire à celle des ARNm cellulaires. Il est reconnu en effet par un anticorps spécifique de la coiffe 5'-méthyl guanosine et interagit avec la protéine *poly A-binding protein* qui se fixe sur une queue poly-A d'environ 150 adénosines [25]. Le site d'initiation de la transcription de l'ARNm d'HDV a été cartographié. Il a été localisé au niveau du nucléotide 1 630 sur le génome d'HDV [25, 26]. Pol II est, elle, impliquée dans la transcription de l'ARNm codant S-HDAG. Elle est en effet inhibée par de faibles doses d' α -amanitine (1–5 μ g/ml), un inhibiteur qui lui est spécifique [27]. L'ARN-G présente un domaine de structure secondaire en tige boucle, allant des positions 1 600 à 1 674 (Figure 4). Il servirait de région promotrice en permettant la liaison du complexe actif de pré-initiation de la Pol II [28, 29]. Comme les ARNm cellulaires, l'ARNm codant l'HDAG est traduit dans le cytoplasme et sa séquence de localisation nucléaire (NLS) réoriente la protéine vers le noyau pour les étapes ultérieures de la réplication. L'ARNm codant la protéine L-HDAG interviendra plus tardivement, après l'édition de l'ARN-AG.

Transcription de l'ARN-AG à partir d'ARN-G d'HDV

La transcription d'ARN à partir d'un ARN repose en principe sur une ARN polymérase-ARN dépendante. La plupart des virus à ARN utilisent ce processus pour leur réplication et, contrairement au virus HDV, codent leur propre réplicase. En revanche, HDV dépend totalement des polymérases de la cellule hôte pour répliquer son génome. Les ARN de l'HDV (HDV-G et HDV-AG) servent alternativement de matrice, dans un modèle de transcription d'ARN de type cercle roulant. Dans une cellule infectée, environ 50 000 copies d'ARN-AG sont synthétisées à partir des matrices ARN-G [19]. *In vitro*, la synthèse de l'ARN-AG résiste à de faibles concentrations d' α -amanitine, inhibitrices de l'activité de la Pol II [30]. Il semble donc que des polymérases cellulaires autres que Pol II, c'est-à-dire Pol I ou Pol III, soient impliquées dans le processus. Les analyses d'adressage métabolique révèlent que l'ARN-AG nouvellement synthétisé est localisé à l'intérieur ou en périphérie du nucléole et demeure dans le noyau [30]. Des expériences de co-immunoprécipitation ont indiqué que S-HDAG interagissait spécifiquement avec le facteur de sélectivité 1 (SL1), un coactivateur de Pol I, et, dans un système *in vitro* de réplication de l'ARN d'HDV, le traitement par un anticorps anti-SL1 diminue la synthèse du brin antigénomique [31]. Un interactome de l'ARN d'HDV, réalisé dans des cellules HeLa, a permis d'identifier plusieurs sous-unités spécifiques de Pol I comme des partenaires potentiels [32].

Pour certains auteurs, l'implication de Pol I ou de Pol III n'est cependant pas formellement démontrée. Le traitement de cellules répliquant l'HDV par des inhibiteurs transcriptionnels, comme l'actinomycine D, le 5,6 dichloro-1- β -D-ribofuranosyl benzamidazole ou l' α -amanitine, ont suggéré que Pol II était impliquée dans la synthèse de l'ARN-AG.

Pour ces auteurs, la quantité d'ARN-AG refléterait un état d'équilibre dans lequel s'additionneraient la transcription proprement dite sur laquelle la Pol II (sensible à l' α -amanitine) pouvait intervenir, mais également l'accumulation des ARN et leur stabilité (apparaissant ainsi résistant à l' α -amanitine) [33].

Si l'ARN-G et l'ARN-AG sont tous deux susceptibles d'interagir avec Pol I, II et III, la fonctionnalité de leur liaison avec Pol I et Pol III reste à déterminer. La participation de Pol I dans la synthèse de l'ARN-AG semblerait cependant importante pour la synthèse des copies complètes d'ARN-AG d'HDV. Lors de la synthèse par cercle roulant de l'ARN-AG, le signal de polyadénylation demeure en effet silencieux et la production d'ARNm est absente [24] ; une transcription par Pol I, dont les transcrits ne sont jamais polyadénylés, semble donc intervenir. La localisation nucléolaire de la synthèse d'ARN-AG serait donc liée à l'activité de Pol I, et une interaction entre des acides aminés de la protéine delta et la nucléoline (C23) a été démontrée.

Transcription de l'ARN-G à partir de la matrice de l'ARN-AG

Cette étape se localise dans le nucléoplasme. Dans la cellule infectée par l'HDV, environ 300 000 copies d'ARN-G y sont détectées [19, 34]. Des expériences menées *in vitro* sur des cellules traitées par l' α -amanitine ont apporté les premiers indices de l'implication de Pol II dans la synthèse de l'ARN-G viral [24]. Différents travaux ont confirmé ces résultats, parmi lesquelles des expériences d'extension *in vitro* de transcrits nucléaires (*run on*), dans lesquelles la synthèse de l'ARN-G était inhibée par de faibles concentrations d' α -amanitine [24]. En 2001, Moraleda et Taylor, en inhibant la synthèse par des doses d' α -amanitine aussi faibles que 0,3 μ g/ml [35], ont confirmé *in vivo* la synthèse de l'ARN-G par Pol II. De même, Filipovska *et al.* [36], utilisant un fragment de l'ARN-AG (l'extrémité en tige-boucle) pour transcrire *in vitro* l'ARN-G dans des extraits nucléaires de cellules HeLa, ont montré que la synthèse de l'ARN-G était extrêmement sensible à l' α -amanitine dans ces extraits nucléaires, confirmant ainsi le rôle possible de Pol II. À noter que cette étude *in vitro* a été réalisée en l'absence de S-HDAG, suggérant la possibilité d'une réaction peu spécifique. L'interaction entre l'ARN d'HDV et la Pol II a été démontrée *in vivo* par co-immunoprécipitation avec le domaine carboxy-terminal de la polymérase [29]. Les expériences de marquage métabolique et les analyses par immunofluorescence des ARN-G synthétisés *de novo* ont par ailleurs révélé que la synthèse de l'ARN-G se produisait dans le nucléoplasme, à la différence de la synthèse des ARN-AG qui s'effectue au niveau nucléolaire [30].

Figure 4. La région promotrice du génome HDV est située en regard d'une extrémité du génome sous sa forme pseudo-double brin près du nucléotide 1640 de la boucle terminale. Ici, sont schématisés l'ARN sous sa forme pseudo-double brin, des protéines du complexe de remodelage de type ISWI (imitation switch) comprenant une protéine

régulatrice BAZ2B et une ATPase (SNF2L et/ou SNF2H) qui sont susceptibles de participer au complexe de pré-initiation de la transcription (PIC) de l'ARN Pol II et des facteurs de transcription associés (à gauche). L'adénosine 1630, site d'initiation de la transcription de l'ARN messager, est marquée en rouge. S-HDAg phosphorylée contribuerait également à lever l'arrêt de l'élongation de Pol II en déstabilisant le complexe NELF (negative elongation factor)-DRB sensitivity inducing factor (DSIF), en entrant en compétition avec la sous-unité NELF-A. Sur l'ARN, S-HDAg est représentée artificiellement sous forme d'octamère. Les tailles respectives de l'ARN viral et des protéines ne sont pas à la même échelle.

Bien que la compréhension de la réplication de l'HDV ne soit pas complète, la participation de la Pol II ADN dépendante pour la transcription de l'ARN-G à partir de l'ARN-AG est désormais admise. Même si les mécanismes enzymologiques précis de la synthèse d'ARN-AG restent discutés, il semble que la réplication des brins d'ARN-G et d'ARN-AG implique très probablement différentes machineries transcriptionnelles.

Les étapes de la réplication d'HDV par la Pol II ADN-dépendante

Pol II a une activité polymérase ADN-dépendante bien caractérisée. Cette enzyme pourrait être issue d'une réplicase primitive, capable de répliquer des génomes ARN et qui aurait commuté vers une matrice ADN. L'ARN Pol II de levure conserve ainsi une activité polymérase ARN-dépendante. HDV est à ce jour le seul virus capable de détourner l'activité de Pol II pour répliquer son ARN chez les mammifères. Dans les extraits nucléaires de cellules HeLa, Wagner *et al.* ont en effet démontré la capacité de la Pol II purifiée à utiliser comme substrat une matrice ARN non-codant cellulaire (l'ARNnc B2), en ajoutant quelques nucléotides afin de déstabiliser l'interaction entre l'ARN et la poche du site actif de la protéine, levant ainsi l'effet inhibiteur de l'ARNnc B2 sur la transcription [37].

L'activité de Pol II peut être divisée en trois phases : initiation, élongation et arrêt. Bien qu'HDV utilise une activité polymérase II ARN dépendante, on peut émettre l'hypothèse que la transcription de son ARN suit ces mêmes étapes spécifiques d'une transcription à partir d'une matrice ADN.

La région promotrice de l'ARN HDV dans sa forme pseudo-double brins

Au cours de la synthèse de l'ARNm delta, la conformation en tige-boucle de l'ARN d'HDV remplacerait l'ADN comme substrat de la Pol II. Une région promotrice bidirectionnelle de la Pol II a été localisée sur l'ADN complémentaire (ADNc) de l'HDV. L'extrémité

5' de l'ARNm codant HDAg est localisée à la position 1630 et une région située entre les nucléotides 1541 et 1630 du génome d'HDV est suffisante pour lancer la synthèse d'ARN-AG. Une mutagenèse dirigée des séquences de ce domaine (la boucle terminale en amont de l'AUG) abroge la réplication [28]. Les extrémités tige-boucles de l'ARN d'HDV se lient à la Pol II et aux protéines TBP (TATA-binding protein), TFII-A, B, E, F, H et S, afin de former, *in vitro*, un complexe de pré-initiation de la transcription (PIC) [38]. Ceci nécessite TFIID, qui se fixe à la boîte TATA des séquences promotrices des gènes et positionne les différents partenaires.

Une synthèse *in vitro* d'ARN-G à partir de la tige boucle terminale de l'ARN-AG a été obtenue en présence du complexe Pol II-TFIIS et de nucléotides tri-phosphate. Cette synthèse s'arrête cependant prématurément en l'absence de co-activateur de Pol II [39]. Les sites d'initiation de transcription de l'ARN d'HDV correspondent donc à des emplacements précis. Cette transcription semble initiée *de novo*, indépendamment de la présence d'une amorce. La transcription mimerait ainsi une transcription d'ARN, ADN-dépendante, en l'absence d'amorce. La transcription de l'ARN d'HDV pourrait néanmoins bénéficier d'amorçage [40] et le site d'initiation de la transcription de l'ARN-G pourrait conserver la conformation tige-boucle pour recruter la Pol II [41].

Initiation

Au cours de la synthèse des ARNm cellulaires, un grand nombre de protéines sont impliquées dans la modification et le remodelage de la chromatine pour faciliter le

recrutement de la Pol II et des facteurs de transcription de la famille TFII dans la région promotrice d'un gène. Ces éléments forment le complexe de pré-initiation de la transcription (PIC). Un tel remaniement de l'ARN d'HDV favorisant le recrutement d'un PIC n'a pas été décrit, probablement du fait que l'ARN d'HDV n'est pas associé à des histones. L'étude de la réplication d'HDV dans des cultures cellulaires repose sur la transfection d'ADNc ou d'ARN de HDV et il a été montré que la présence de S-HDAg était cruciale pour une réplication efficace de l'ARN d'HDV [42]. *In vitro*, une S-HDAg fonctionnelle doit en effet être produite pour cette réplication. Elle peut l'être de façon endogène, par transfection d'un vecteur compatible pour la réplication et l'expression de l'ARNm codant S-HDAg. Il est alors nécessaire d'effectuer une co-transfection avec un ARNm ou un plasmide codant la protéine S-HDAg. La réplication du vecteur déficient est trans-complémentée par un ARN codant une protéine S-HDAg fonctionnelle. S-HDAg pourrait avoir un rôle dans le recrutement de facteurs cellulaires susceptibles de contribuer au PIC sur l'ARN AG pour recruter la Pol II au niveau intranucléaire, indépendamment de son rôle d'adressage au noyau. En fait, S-HDAg possède plusieurs caractéristiques de régulateurs transcriptionnels, comme des domaines proches des crémaillères à leucine, des super-hélices et hélice-boucle-hélice. S-HDAg est acétylée sur la lysine 72 (K72) par une acétyltransférase d'histone, possiblement p300/CBP (*CREB-binding protein*). Pour cette modification post-traductionnelle essentielle à la synthèse de l'ARN-G [43], S-HDAg interagirait avec p300 et le facteur de transcription *Yin-Yang 1* (YY1). YY1 est une protéine multifonctionnelle qui régule la transcription de gènes et les modifications post-traductionnelles de protéines. Une co-sédimentation de S-HDAg avec YY1, associé à un complexe nucléaire de protéines de haut poids moléculaire [44] a pu être révélée par centrifugation en gradient de sucrose, le complexe ainsi isolé comprenant également p300. L'hyper-expression d'YY1 et/ou de P300/CBP favorise la réplication d'HDV. Au contraire, un mutant du gène codant p300, déficient pour son activité acétyltransférase, la réprime [44]. L'implémentation du PIC repose sur un ensemble d'enzymes de modification d'histones impliquées dans les marques épigénétiques à l'origine du recrutement des enzymes responsables du remodelage de la chromatine. p300 est une protéine d'interaction polyvalente qui est impliquée dans les modifications épigénétiques d'histones et qui favorisent l'accès à la chromatine de la Pol II pour la transcription de gènes. S-HDAg, par son interaction avec le génome de HDV et à la suite de son acétylation, participerait à la mise en place d'un PIC pour recruter Pol II sur l'ARN viral. Nous avons récemment montré que BAZ2B (*bromodomain-associated to zinc finger protein 2B*), la sous-unité régulatrice de facteurs de remodelage à bromodomaine (BRF), interagissait avec S-HDAg exprimée dans des cellules de la lignée hépatique HepaRG différenciées, et dans des hépatocytes primaires humains, sur un motif mimant l'extrémité N-terminale acétylée de l'histone H3 (Figure 4) [45]. L'analyse de l'interactome de S-HDAg, déterminé par des expériences de capture d'affinité suivie de l'identification des interactants par spectrométrie de masse, a révélé la présence de plusieurs sous-unités de Pol II associées [32]. L'hypothèse selon laquelle S-HDAg pourrait être le médiateur principal pour l'établissement d'un PIC souligne ainsi

l'importance d'étudier son implication dans la synthèse de l'ARNm et de l'ARN-G.

Élongation

Comme pour la synthèse des ARN cellulaires, un mécanisme de pause transcriptionnelle semble se produire au cours de la phase d'élongation précoce de l'ARN-G de l'HDV [48] (→). Pol II a en effet tendance à s'arrêter au niveau d'une zone proximale du promoteur correspondant aux 100 premiers nucléotides environ. Cet arrêt prématuré dans l'élongation résulte en partie de l'association de la polymérase avec deux facteurs : DSIF (*DRB sensitivity-inducing factor*) et NELF (*negative elongation factor*). La maturation de Pol II aboutissant à une phase d'élongation productive nécessite en fait l'activité de la kinase P-TEFb (*positive transcription elongation factor b*) qui, phosphorylant le complexe DSIF/NELF, provoque la séparation de NELF et de Pol II et permet la transformation de DSIF qui favorise alors l'élongation. La phosphorylation par P-TEFb des résidus sérine en position 2 d'un motif de sept acides aminés répété 52 fois dans le domaine C-terminal de la plus grande sous-unité de Pol II créerait également une plate-forme d'ancrage pour des facteurs d'épissage de l'ARN et de modification de la chromatine qui facilitent la synthèse de l'ARN.

Un mécanisme similaire de pause est observé au cours de la phase précoce de l'élongation du génome de HDV. L'élongation est cependant fortement stimulée en présence de S-HDAg. Yamaguchi *et al.* [38] ont en effet proposé que S-HDAg entre en compétition avec NELF-A vis-à-vis de Pol II afin de rétablir une élongation productive. S-HDAg jouerait ainsi le rôle de P-TEFb dans la réactivation de la polymérase. L'association entre Pol II et S-HDAg est par ailleurs renforcée lorsque S-HDAg est phosphorylée sur sa sérine en position 177 et lorsque les sérines en position 2 et 5 de Pol II sont hyperphosphorylées par P-TEFb [43].

Terminaison

L'arrêt de synthèse de l'ARN d'HDV au cours de la polymérisation en cercle roulant reste une étape encore explorée à ce jour. L'analyse en transfert-hybridation des ARN de foies infectés de marmotte d'Amérique du Nord a néanmoins permis de mettre en évidence les formes monomères, dimères et trimères des ARN de l'HDV (Figure 3d).

Un rôle de la protéine virale S-HDAg dans la réplication des ARN d'HDV

Chaque isoforme de la protéine HDAg, S-HDAg ou L-HDAg, a une tâche différente. En effet, la réplica-

(→) Voir la Synthèse de A. Furlan *et al.*, m/s août-septembre 2018, page 685

tion d'HDV nécessite S-HDAg tandis que L-HDAg est essentielle pour l'assemblage de la particule virale. Les interactions entre S-HDAg et L-HDAg s'établissent lors de leur multimérisation et lors de leur fixation sur l'ARN-G (ou l'ARN-AG) pseudo-double brin. L'édition de l'ARN suivie de la production de L-HDAg entraîne un état d'équilibre entre synthèse des composants viraux et assemblage des particules, suivi de leur production. Quelles fonctions peut-on attribuer à la petite protéine S-HDAg dans l'activation de la transcription et de la réplication des ARN du virus HDV ?

La petite protéine delta pourrait intervenir à plusieurs niveaux dans la réplication des ARN du virus. La translocation de l'ARN d'HDV dans le noyau repose sur S-HDAg et, en son absence, l'ARN d'HDV s'accumule dans le cytoplasme de la cellule. Lors de l'infection virale, la première tâche de S-HDAg est donc de transférer l'ARN d'HDV dans le noyau de la cellule où se réalise la réplication de l'ARN viral. Bien que décrit initialement comme un signal de localisation nucléaire composé de deux parties, la séquence NLS de S-HDAg a été associée préférentiellement à la partie C-terminale du peptide delta EGAPPAKRAR, correspondant aux acides aminés 66-75 [46]. La méthylation ne serait pas nécessaire à cette étape de transport de l'ARN-G [47]. La phosphorylation, la méthylation et l'acétylation de la protéine sont par contre indispensables pour la synthèse de l'ARNm à partir de l'ARN-G et de l'ARN-G à partir de la matrice AG. Ces modifications post-traductionnelles ne sont au contraire pas requises pour la synthèse de l'ARN-AG à partir de l'ARN-G. Cette différence suggère l'implication dans la cellule de deux machineries de transcription différentes. Sous l'influence de facteurs cellulaires négatifs d'élongation (DSIF et NELF) (Figure 4, partie droite), la transcription de l'ARN s'arrête. Ce blocage pourrait être levé par S-HDAg : il déplacerait le facteur négatif d'élongation NELF-A en entrant en compétition avec ce dernier vis-à-vis de la partie carboxy-terminale de la Pol II.

Nous avons récemment montré que S-HDAg pouvait interagir *in vitro* et *in vivo* avec des complexes de remodelage de la chromatine, en particulier avec la protéine régulatrice à bromodomaine BAZ2B (Figure 4, partie gauche). Le recrutement de ce type de plateforme de remodelage sur la RNP d'HDV pourrait contribuer à recruter l'ARN Pol II sur l'ARN viral [45].

Conclusion

Le génome de l'HDV est un ARN circulaire de structure analogue à celle d'un viroïde qui se réplique par un mécanisme de réplication en cercle roulant faisant intervenir des polymérases cellulaires. Les ARN multimériques apparaissent comme des intermédiaires de réplication. Des similitudes et des différences existent entre la synthèse de l'ARNm et celle des ARN-G et ARN-AG de l'HDV. Elles font suspecter l'utilisation dans la cellule de machineries transcriptionnelles différentes pour la production des ARN messagers et génomiques d'HDV et pour la production des ARN viraux AG. Les sites de transcription seraient ainsi préférentiellement nucléoplasmique pour l'ARNm et l'ARN-G, en faisant intervenir la Pol II et nucléolaire pour l'ARN-AG, reposant probablement sur la Pol I ou la Pol III. ♦

SUMMARY

Hepatitis delta virus replication and the role of the small hepatitis delta protein S-HDAg

Hepatitis delta virus (HDV) is a mammalian defective virus. Its genome is a small single-stranded circular RNA of approximately 1,680 nucleotides. To spread, HDV relies on hepatitis B virus envelope proteins that are needed for viral particle assembly and egress. Severe clinical features of HBV-HDV infection include acute fulminant hepatitis and chronic liver fibrosis leading to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. One uniqueness of HDV relies on its genome similarity to viroids, small plant infectious uncoated RNAs. Devoid of viral replicase activity, HDV has to use host DNA-dependant RNA Pol II to replicate its genomic RNA. Thus, one can ask how does this replication occur? We describe first here the major steps of the viral RNA transcription and replication and then we detail the role of the Small HD protein in these processes, especially with regard to the Pol II recruitment. ♦

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

1. Rizzetto M, Canese MG, Arico S, et al. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut* 1977 ; 18 : 997-1003.
2. Rizzetto M, Hoyer B, Canese MG, et al. delta Agent: association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980 ; 77 : 6124-8.
3. Sureau C, Negro F. The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis. *J Hepatol* 2016 ; 64 : S102-16.
4. Lempp FA, Urban S. Hepatitis delta virus: Replication strategy and upcoming therapeutic options for a neglected human pathogen. *Viruses* 2017 ; 9 : pii: E172. doi: 10.3390/v9070172
5. Alfaïete D, Deny P, Durantel D. Hepatitis delta virus: From biological and medical aspects to current and investigational therapeutic options. *Antiviral Res* 2015 ; 122 : 112-29.
6. Abeywickrama-Samarakoon N, Cortay JC, Deny P. The hepatitis D satellite virus of hepatitis B virus: half-opening a new era to control viral infection? *Curr Opin Infect Dis* 2016 ; 29 : 645-53.
7. Sureau C, Moriarty AM, Thornton GB, Lanford RE. Production of infectious hepatitis delta virus in vitro and neutralization with antibodies directed against hepatitis B virus pre-S antigens. *J Virol* 1992 ; 66 : 1241-5.
8. Bonino F, Heermann KH, Rizzetto M, Gerlich WH. Hepatitis delta virus: protein composition of delta antigen and its hepatitis B virus-derived envelope. *J Virol* 1986 ; 58 : 945-50.
9. Sureau C, Guerra B, Lanford RE. Role of the large hepatitis B virus envelope protein in infectivity of the hepatitis delta virion. *J Virol* 1993 ; 67 : 366-72.
10. Yan H, Zhong G, Xu G, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife* 2012 ; 1 : e00049.
11. Le Duff Y, Blanchet M, Sureau C. The pre-S1 and antigenic loop infectivity determinants of the hepatitis B virus envelope proteins are functionally independent. *J Virol* 2009 ; 83 : 12443-51.
12. Gripon P, Cannie I, Urban S. Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein. *J Virol* 2005 ; 79 : 1613-22.
13. Griffin BL, Chasovskikh S, Dritschilo A, Casey JL. Hepatitis delta antigen requires a flexible quasi-double-stranded RNA structure to bind and condense hepatitis delta virus RNA in a ribonucleoprotein complex. *J Virol* 2014 ; 88 : 7402-11.

RÉFÉRENCES

14. Villiers MB, Cortay JC, Cortes S, et al. Protein-peptide arrays for detection of specific anti-hepatitis D virus (HDV) genotype 1, 6, and 8 antibodies among HDV-infected patients by surface plasmon resonance imaging. *J Clin Microbiol* 2015 ; 53 : 1164-71.
15. Wang JG, Jansen RW, Brown EA, Lemon SM. Immunogenic domains of hepatitis delta virus antigen: peptide mapping of epitopes recognized by human and woodchuck antibodies. *J Virol* 1990 ; 64 : 1108-16.
16. Zuccola HJ, Rozzelle JE, Lemon SM, et al. Structural basis of the oligomerization of hepatitis delta antigen. *Structure* 1998 ; 6 : 821-30.
17. Glenn JS, Taylor JM, White JM. In vitro-synthesized hepatitis delta virus RNA initiates genome replication in cultured cells. *J Virol* 1990 ; 64 : 3104-7.
18. Deny P. Hepatitis delta virus genetic variability: from genotypes I, II, III to eight major clades? *Curr Top Microbiol Immunol* 2006 ; 307 : 151-71.
19. Chen PJ, Kalpana G, Goldberg J, et al. Structure and replication of the genome of the hepatitis delta virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 8774-8.
20. Polson AG, Bass BL, Casey JL. RNA editing of hepatitis delta virus antigenome by dsRNA-adenosine deaminase. *Nature* 1996 ; 380 : 454-6.
21. Huang HC, Lee CP, Liu HK, et al. Cellular nuclear export factors TAP and Aly are required for HDV-L-mediated assembly of hepatitis delta virus. *J Biol Chem* 2016 ; 291 : 26226-38.
22. Beeharry Y, Goodrum G, Imperiale CJ, Pelchat M. The Hepatitis Delta Virus accumulation requires paraspeckle components and affects NEAT1 level and PSP1 localization. *Sci Rep* 2018 ; 8 : 6031.
23. Taylor JM. Structure and replication of hepatitis delta virus RNA. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006 ; 307 : 1-23.
24. MacNaughton TB, Lai MM. HDV RNA replication: ancient relic or primer? *Curr Top Microbiol Immunol* 2006 ; 307 : 25-45.
25. Gudima S, Wu SY, Chiang CM, et al. Origin of hepatitis delta virus mRNA. *J Virol* 2000 ; 74 : 7204-10.
26. Modahl LE, Lai MM. Transcription of hepatitis delta antigen mRNA continues throughout hepatitis delta virus (HDV) replication: a new model of HDV RNA transcription and replication. *J Virol* 1998 ; 72 : 5449-56.
27. Modahl LE, MacNaughton TB, Zhu N, et al. RNA-dependent replication and transcription of hepatitis delta virus RNA involve distinct cellular RNA polymerases. *Mol Cell Biol* 2000 ; 20 : 6030-9.
28. Beard MR, MacNaughton TB, Gowans EJ. Identification and characterization of a hepatitis delta virus RNA transcriptional promoter. *J Virol* 1996 ; 70 : 4986-95.
29. Greco-Stewart VS, Miron P, Abraham A, Pelchat M. The human RNA polymerase II interacts with the terminal stem-loop regions of the hepatitis delta virus RNA genome. *Virology* 2007 ; 357 : 68-78.
30. MacNaughton TB, Shi ST, Modahl LE, Lai MM. Rolling circle replication of hepatitis delta virus RNA is carried out by two different cellular RNA polymerases. *J Virol* 2002 ; 76 : 3920-7.
31. Li YJ, MacNaughton T, Gao L, Lai MM. RNA-templated replication of hepatitis delta virus: genomic and antigenomic RNAs associate with different nuclear bodies. *J Virol* 2006 ; 80 : 6478-86.
32. Cao D, Haussecker D, Huang Y, Kay MA. Combined proteomic-RNAi screen for host factors involved in human hepatitis delta virus replication. *RNA* 2009 ; 15 : 1971-9.
33. Chang J, Nie X, Chang HE, et al. Transcription of hepatitis delta virus RNA by RNA polymerase II. *J Virol* 2008 ; 82 : 1118-27.
34. Gudima S, Chang J, Moraleda G, et al. Parameters of human hepatitis delta virus genome replication: the quantity, quality, and intracellular distribution of viral proteins and RNA. *J Virol* 2002 ; 76 : 3709-19.
35. Moraleda G, Taylor J. Host RNA polymerase requirements for transcription of the human hepatitis delta virus genome. *J Virol* 2001 ; 75 : 10161-9.
36. Filipovska J, Konarska MM. Specific HDV RNA-templated transcription by pol II in vitro. *RNA* 2000 ; 6 : 41-54.
37. Wagner SD, Yakovchuk P, Gilman B, et al. RNA polymerase II acts as an RNA-dependent RNA polymerase to extend and destabilize a non-coding RNA. *EMBO J* 2013 ; 32 : 781-90.
38. Abraham A, Pelchat M. Formation of an RNA polymerase II preinitiation complex on an RNA promoter derived from the hepatitis delta virus RNA genome. *Nucleic Acids Res* 2008 ; 36 : 5201-11.
39. Lehmann E, Brueckner F, Cramer P. Molecular basis of RNA-dependent RNA polymerase II activity. *Nature* 2007 ; 450 : 445-9.
40. Yamaguchi Y, Filipovska J, Yano K, et al. Stimulation of RNA polymerase II elongation by hepatitis delta antigen. *Science* 2001 ; 293 : 124-7.
41. Beeharry Y, Rocheleau L, Pelchat M. Conserved features of an RNA promoter for RNA polymerase II determined from sequence heterogeneity of a hepatitis delta virus population. *Virology* 2014 ; 450-451 : 165-73.
42. Lazinski DW, Taylor JM. Relating structure to function in the hepatitis delta virus antigen. *J Virol* 1993 ; 67 : 2672-80.
43. Mu JJ, Tsay YG, Juan LJ, et al. The small delta antigen of hepatitis delta virus is an acetylated protein and acetylation of lysine 72 may influence its cellular localization and viral RNA synthesis. *Virology* 2004 ; 319 : 60-70.
44. Huang WH, Mai RT, Lee YH. Transcription factor YY1 and its associated acetyltransferases CBP and p300 interact with hepatitis delta antigens and modulate hepatitis delta virus RNA replication. *J Virol* 2008 ; 82 : 7313-24.
45. Abeywickrama-Samarakoon N, Deny P, Guerrieri F, et al. Small Hepatitis Delta antigen mimics histones to recruit a chromatin remodeler on the pseudo-chromatinized Hepatitis D Virus RNA. In : Liang TJ, Kramvis A, eds. *Molecular Biology of Hepatitis B virus*. Washington, USA : The Hepatitis B Foundation, 2017 : 089.
46. Alves C, Freitas N, Cunha C. Characterization of the nuclear localization signal of the hepatitis delta virus antigen. *Virology* 2008 ; 370 : 12-21.
47. Li YJ, Stallcup MR, Lai MM. Hepatitis delta virus antigen is methylated at arginine residues, and methylation regulates subcellular localization and RNA replication. *J Virol* 2004 ; 78 : 13325-34.
48. Furlan A, Agbazhou F, Henry M, et al. La levée de pause transcriptionnelle : un mécanisme de régulation crucial pour la cellule. *Med Sci (Paris)* 2018 ; 34 : 685-92.

TIRÉS À PART
P. Dény

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

la Société Française de Myologie
www.sfmyologie.org

la filière de santé neuromusculaire FILNEMUS
www.filnemus.fr

sfm
SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MYOLOGIE

Filnemus
Filière Neuromusculaire

Tarifs d'abonnement m/s - 2018

Abonnez-vous
à médecine/sciences

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

Bulletin d'abonnement
page 890 dans ce numéro de m/s