



RÉFÉRENCES

1. Palmert MR, Boepple PA. Variation in the timing of puberty: clinical spectrum and genetic investigation. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 ; 86 : 2364-8.
2. Parent AS, Franssen D, Fudvoye J, et al. Developmental variations in environmental influences including endocrine disruptors on pubertal timing and neuroendocrine control: Revision of human observations and mechanistic insight from rodents. *Front Neuroendocrinol* 2015 ; 38 : 12-36.
3. Franceschini I, Desroziers E. Development and aging of the kisspeptin-GPR54 system in the mammalian brain: What are the impacts on female reproductive function? *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013 ; 4 : 22.
4. Adlanmerini M, Fabre A, Boudou F, et al. Effets membranaires du récepteur alpha des œstrogènes : une question de spécificité tissulaire. *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 1083-91.
5. Stavrou I, Zois C, Chatzikiyakidou A, et al. Combined estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta genotypes influence the age of menarche. *Hum Reprod* 2006 ; 21 : 554-7.
6. Mendoza N, Morón FJ, Quereda F, et al. A digenic combination of polymorphisms within ESR1 and ESR2 genes are associated with age at menarche in the Spanish population. *Reprod Sci* 2008 ; 15 : 305-11.
7. Mayer C, Acosta-Martinez M, Dubois SL, et al. Timing and completion of puberty in female mice depend on estrogen receptor alpha-signaling in kisspeptin neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010 ; 107 : 22693-8.
8. Antal MC, Krust A, Chambon P, Mark M. Sterility and absence of histopathological defects in nonreproductive organs of a mouse ERbeta-null mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 ; 105 : 2433-8.
9. Naulé L, Robert, Parmentier C, et al. Delayed pubertal onset and pre-pubertal Kiss1 expression in female mice lacking central estrogen receptor beta. *Hum Mol Genet* 2015 ; 24 : 7326-38.
10. Paech K, Webb P, Kuiper GG, et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* 1997 ; 277 : 1508-10.
11. Gonzales KL, Tetel MJ, Wagner CK. Estrogen receptor (ER) beta modulates ERalpha responses to estrogens in the developing rat ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Endocrinology* 2008 ; 149 : 4615-21.
12. Catteau-Jonard S, Dewailly D, Prévot V, et al. L'hormone anti-müllérienne : une hormone ovarienne exerçant une rétroaction hypothalamique ? *Med Sci (Paris)* 2016 ; 32 : 441-4.

NOUVELLE

Virus de l'hépatite B et chromatine

Une protéine virale, HBx, interfère avec la machinerie épigénétique de la cellule

Lise Rivière^{1,2}, Laetitia Gérossier³, Olivier Hantz³, Christine Neuveut^{1,2}

¹ Unité des Hépacivirus et immunité innée, Institut Pasteur, 28, rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France ;

² UMR CNRS 3569, 28, rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France ;

³ Inserm U1052, CNRS UMR5, Centre de recherche en cancérologie de Lyon, université de Lyon, F-69000 Lyon, France.

lise.riviere@pei.de

christine.neuveut@pasteur.fr

L'ADNccc du virus de l'hépatite B : une forme virale résistante aux traitements

Dans le monde, environ 300 000 personnes sont chroniquement infectées par le virus de l'hépatite B (VHB) et encourent un risque élevé de développer un carcinome hépatocellulaire [1]. Les traitements antiviraux existant contrôlent efficacement la réplication virale sans toutefois éliminer l'ADN viral nucléaire qui reste présent au sein des cellules infectées. Cet ADN, appelé « ADN circulaire covalamment clos » (ADNccc), est à l'origine de l'expression des gènes viraux et de la production de virus. Ces traitements doivent donc être pris à vie afin d'éviter toute réactivation virale. Le développement de nouveaux traitements visant notamment à éliminer l'ADNccc ou contrôler sa transcription nécessite donc de comprendre les mécanismes qui contrôlent l'expression et le maintien de cet ADNccc.

Les particules du VHB contiennent un génome d'ADN circulaire partiellement

double brin (ADN-RC). Au cours de l'infection, le génome, transporté jusqu'au noyau, est converti en ADNccc après action de la machinerie cellulaire (ou de protéines cellulaires). L'ADNccc sert alors de matrice pour la transcription des ARN viraux, dont l'ARN pré-génomique qui est encapsidé au niveau du cytoplasme de la cellule infectée et rétrotranscrit en ADN-RC. L'ADNccc n'est pas intégré dans l'ADN cellulaire. Cependant, à l'instar de celui-ci, il est organisé sous forme de chromatine et exploite des mécanismes cellulaires pour réguler sa transcription (Figure 1).

La transcription virale, comme celle des gènes cellulaires, est régulée par des mécanismes de remodelage de la chromatine

L'organisation de l'ADN sous forme de chromatine le rend moins accessible aux facteurs de transcription. L'activation de la transcription des gènes dépend donc de mécanismes permettant d'augmenter

l'accessibilité de l'ADN aux facteurs soit en déplaçant les nucléosomes sur l'ADN, soit en réduisant les forces permettant son association aux histones via la modification post-traductionnelle (MPT) de ces dernières (Tableau 1). Ces modifications reposent sur des enzymes cellulaires dont les histone acétyltransférases (HAT) et les histone méthyltransférases (HMT) qui sont respectivement responsables de l'acétylation et de la méthylation des histones, et les histone déacétylases (HDAC) et histone déméthylases (HDM) qui effacent ces marques.

La transcription de l'ADNccc semble également régulée par des modifications post-traductionnelles touchant les histones. En effet, chez des patients chroniquement infectés par le VHB, une corrélation est observée entre virémie et niveau d'acétylation des histones qui sont associées à l'ADNccc [2]. L'activation de la transcription de l'ADNccc est aussi contrôlée par les HAT CBP (*CREB binding protein*)/P300 et par

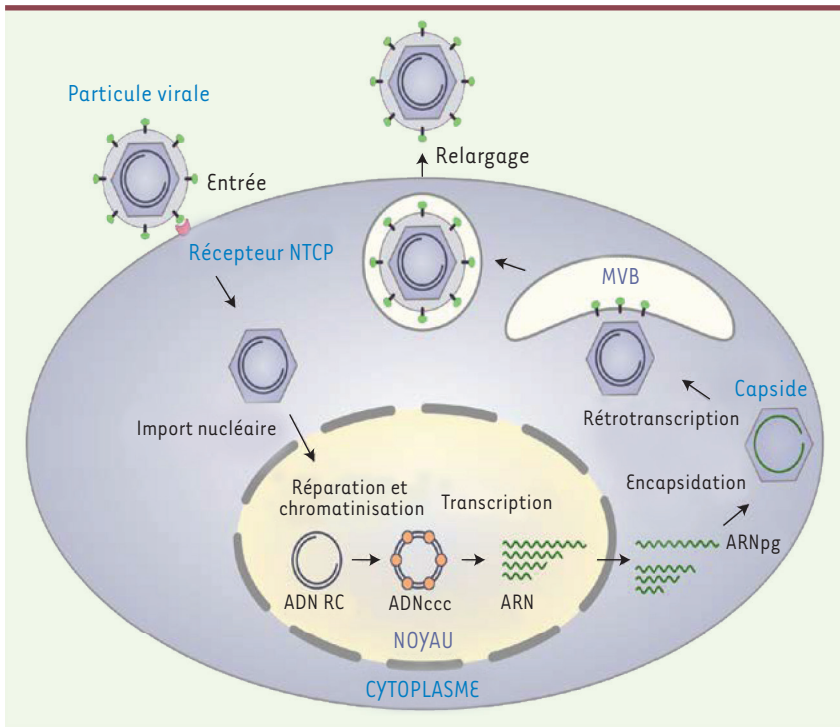


Figure 1. Cycle de réplication du VHB. La particule virale contenant l'ADN viral partiellement double brin (ADN-RC) entre dans la cellule suite à son interaction avec le récepteur : le *sodium-taurocholate cotransporting polypeptide* (NTCP). La capsid contenant le génome viral est ensuite importée dans le noyau où l'ADN viral est libéré. L'ADN-RC est alors réparé par des facteurs cellulaires et converti en ADNccc. L'ADNccc s'associe avec des protéines cellulaires histones en une structure chromatinienne. Il est alors transcrit en ARN, permettant la production des protéines virales. L'ARN pré-génomique est encapsidé dans les capsides néosynthétisées et rétrotranscrit en ADN-RC. Après acquisition d'une enveloppe au niveau des corps multivésiculaires (MVB), les nouvelles particules virales sont relarguées de la cellule par exocytose. ADN-RC : ADN relâché circulaire ; ADNccc : ADN circulaire covalentement clos ; ARNpg : ARN pré-génomique.

l'acétylation des histones H3 et H4. Une étude récente a de plus cartographié les modifications des histones associées à l'ADNccc. Elle montre l'existence d'une corrélation entre ces MPT activatrices et l'activité transcriptionnelle des promoteurs du virus [2-5].

La protéine régulatrice virale HBx : une petite protéine, pilier indispensable de la transcription virale *in vivo*

La protéine virale régulatrice HBx est essentielle à la réplication virale. Elle agit principalement en activant la transcription du VHB. Ainsi, son rôle

dans la régulation de la chromatine de l'ADNccc a été suggéré. Le recrutement d'HBx sur l'ADNccc est en effet corrélé avec celui des HAT CBP/P300 et du facteur PCAF (*P300/CBP-associated factor*), ainsi qu'avec l'acétylation des histones et l'activation transcriptionnelle du VHB [3]. Nous avons montré qu'HBx interagit avec des facteurs cellulaires qui sont impliqués dans la régulation de la transcription et de la chromatine dont elle modifie l'activité. C'est le cas de CBP/P300, de PRMT1 (*protein arginine N-methyltransferase 1*) ou du complexe HDAC1 (*histone deacetylase 1*)/PP1 (*protein phosphatase 1*) [4, 6, 7].

Cependant l'absence de modèles cellulaires permissifs à l'infection a longtemps retardé l'étude du rôle d'HBx dans la régulation épigénétique dans le contexte de l'infection.

Rôle d'HBx dans le contexte de l'infection par le VHB : HBx contrecarre la répression transcriptionnelle de l'ADNccc médiée par la voie SETDB1/HP1/H3K9me3

L'étude que nous avons réalisée portait sur le rôle d'HBx dans la transcription de l'ADNccc dans le contexte de l'infection par le virus. Des hépatocytes humains primaires ainsi qu'une lignée cellulaire

Type d'histone	Acide aminé modifié	Modification	Abréviation	Conséquence
H3	lysines 4, 9, 14, 18	acétylation	H3ac	activation de la transcription
H4	lysines 5, 8, 12, 16	acétylation	H4ac	activation de la transcription
H3	lysine 4	méthylation	H3K4me	activation de la transcription
H3	lysine 9	méthylation	H3K9me	inhibe la transcription
H3	lysine 27	méthylation	H3K27me	inhibe la transcription

Tableau I. Principales modifications post-traductionnelles (MPT) de type acétylation et méthylation des histones et leurs conséquences sur la transcription.

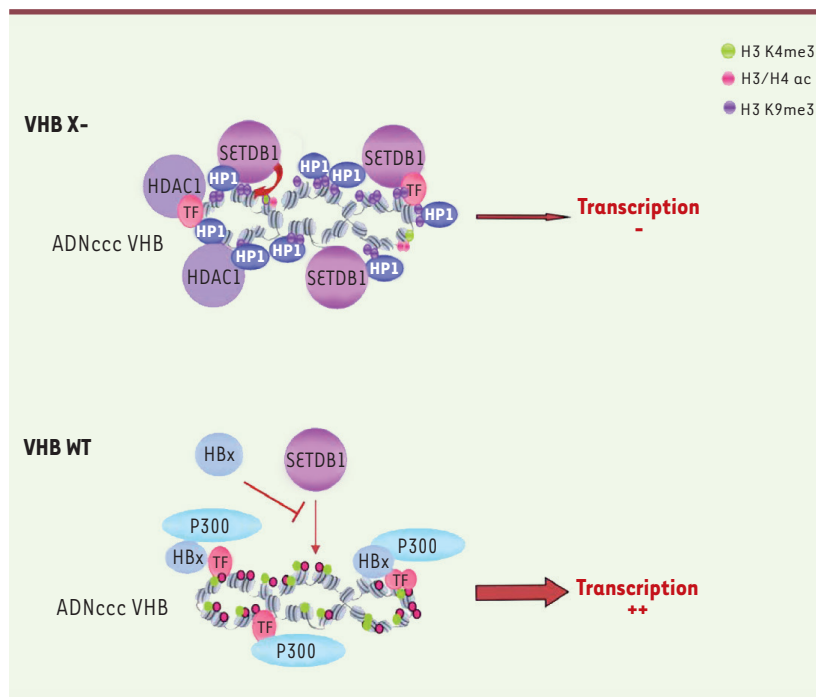


Figure 2. HBx contrecarre la répression transcriptionnelle de l'ADNccc médiée par la voie SETDB1/HP1/H3K9me3. En l'absence d'HBx (VHB X-), la transcription du virus est réprimée via la déacétylation des histones, la mise en place des marques répressives H3K9me3 par SETDB1 et le recrutement des facteurs répresseurs HP1. L'expression d'HBx contrecarre l'activité de SETDB1 inhibant le positionnement des marques répressives H3K9me3 et permettant l'établissement de marques activatrices de la transcription comme l'acétylation des histones et la mise en place des marques H3K4me3, aboutissant ainsi à une forte transcription virale. ADNccc : ADN circulaire covalamment clos ; HBx : protéine X du virus de l'hépatite B ; SETDB1 : SET domain, bifurcated 1 ; HP1 : heterochromatin protein 1 ; H3K9me3, H3K4me3 : histone 3 triméthylée au niveau de la lysine 9 ou 4 respectivement ; H3/H4 ac : histones H3/H4 acétylées ; HDAC1 : histone déacétylase 1 ; TF : facteur de transcription ; VHB WT : virus de l'hépatite B sauvage.

permissive à l'infection par le VHB (les cellules HepaRG¹ différenciées) ont été utilisés. Nous avons suivi la réplication et la transcription virales après infection de ces cellules soit par un virus sauvage (VHB wt), soit par un virus déficient pour l'expression d'HBx (VHB X-). Les résultats que nous avons obtenus ont permis de confirmer que la transcription du virus VHB était réprimée en l'absence d'HBx. Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la transcription des gènes de VHB, nous avons étudié la structure de l'ADNccc formé après infection des cellules par le VHB wt ou le virus muté VHB X-. En évaluant la sensibilité de l'ADNccc à la digestion par la nucléase micrococcale, nous avons pu montrer que l'ADNccc du VHB X- était plus résistant à la digestion que l'ADNccc du VHB wt. Ceci suggérait que l'ADNccc du virus VHB X- présentait une structure plus compacte, et donc moins accessible à la machinerie de transcription que celui du virus sauvage, un résultat pouvant expliquer, en partie, sa faible transcription.

Différents mécanismes interviennent dans la modulation de la chromatine dont les MPT des histones. Par immunoprécipitation de la chromatine, associée à des PCR quantitatives, nous avons montré que les histones, associées à l'ADNccc du VHB wt, présentaient des modifications activatrices (H3ac, H3K4me3). En revanche, sur l'ADNccc du virus muté VHB X-, nous avons observé un enrichissement en modifications répressives, notamment H3K9me2 et H3K9me3. Ces modifications, notamment retrouvées au niveau de l'hétérochromatine, permettent le recrutement des protéines cellulaires HP1 (*heterochromatin protein 1*), qui amplifient la répression transcriptionnelle. Nous avons observé que les 3 isoformes de ces protéines (HP1 α , γ et β) étaient recrutées de façon plus importante sur l'ADNccc du VHB X-.

L'enzyme cellulaire responsable de la méthylation répressive H3K9me3 de l'ADNccc du VHB X- a été déterminée après extinction, par la technique d'ARN interférence, de l'expression de chacune des trois HMT cellulaires susceptibles d'induire une telle modification : SUV39H1, SUV39H2 et SETDB1. Nos résultats montrent que seule la déplétion de SETDB1 réduit significativement la méthylation H3K9me3 et permet

de restaurer partiellement la transcription du VHB X-, suggérant ainsi que SETDB1 est impliquée dans la répression transcriptionnelle du virus muté.

Ayant montré qu'HBx pouvait interférer avec la mise en place de la répression transcriptionnelle de l'ADNccc, sa capacité à contrecarrer cette répression une fois qu'elle a été établie, a ensuite été examinée. Sept jours après leur infection par le VHB X-, les cellules infectées ont donc été transduites avec un vecteur lentiviral contenant le gène codant HBx. Les résultats montrent qu'HBx restaure la transcription du VHB X- et que cette transcription est corrélée à une diminution des marques répressives H3K9me3 et du recrutement d'HP1, et à une augmentation des marques activatrices.

Conclusion

Nos connaissances sur la biologie de l'ADNccc sont encore très limitées en raison de l'absence durant des décennies de modèles permissifs à l'infection par le VHB et la formation de l'ADNccc. Nos travaux ont permis de montrer que, dans le contexte de l'infection, HBx est nécessaire à la transcription de l'ADNccc. Il permet l'établissement d'une chromatine

¹ Ces cellules ont été obtenues à partir d'une tumeur isolée d'une patiente présentant un hépatocarcinome.

transcriptionnellement active (Figure 2) [8]. Des travaux récents suggèrent que HBx interfère avec la réponse cellulaire antivirale qui réprime la transcription virale [9, 10]. Nos résultats permettent de mieux comprendre les mécanismes de cette répression. Ils suggèrent qu'elle est mise en place, en partie, via l'établissement d'une chromatine réprimée reposant sur des mécanismes associant SETDB1/HP1/H3K9me3. De nombreuses questions restent cependant à résoudre : quels sont les mécanismes cellulaires impliqués dans la reconnaissance de l'ADNccc ? Par quel mécanisme SETDB1 est-elle recrutée sur l'ADNccc et inhibée en présence d'HBx ; HBx cible-t-elle directement SETDB1, ou un de ses partenaires, ou agit-elle sur des facteurs situés plus en amont et respon-

sables de la détection de l'ADN viral et de sa répression transcriptionnelle ?

Hepatitis B virus and chromatin remodeling: HBx counteracts SETDB1/HP1/H3K9me3 transcriptional silencing

RÉFÉRENCES

1. Buendia MA, Neuveut C. Hepatocellular carcinoma. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015; 5 : a021444.
2. Pollicino T, Belloni L, Raffa G, et al. Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones. *Gastroenterology* 2006 ; 130 : 823-37.
3. Belloni L, Pollicino T, De Nicola F, et al. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 106 : 19975-9.
4. Cougot D, Wu Y, Cairo S, et al. The hepatitis B virus X protein functionally interacts with CREB-binding protein/p300 in the regulation of CREB-mediated transcription. *J Biol Chem* 2007 ; 282 : 4277-87.

5. Tropberger P, Mercier A, Robinson M, et al. Mapping of histone modifications in episomal HBV cccDNA uncovers an unusual chromatin organization amenable to epigenetic manipulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015 ; 112 : E5715-24.
6. Benhenda S, Ducroux A, Riviere L, et al. The PRMT1 methyltransferase is a binding partner of HBx and a negative regulator of hepatitis B virus transcription. *J Virol* 2013 ; 87 : 4360-71.
7. Cougot D, Allemand E, Riviere L, et al. Inhibition of PP1 Phosphatase Activity by HBx: A Mechanism for the Activation of Hepatitis B Virus Transcription. *Sci Signal* 2012 ; 5 : ra1.
8. Riviere L, Grossier L, Ducroux A, et al. HBx relieves chromatin-mediated transcriptional repression of hepatitis B viral cccDNA involving SETDB1 histone methyltransferase. *J Hepatol* 2015 ; 63 : 1093-102.
9. Lucifora J, Arzberger S, Durantel D, et al. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J Hepatol* 2011 ; 55 : 996-1003.
10. Van Breugel PC, Robert EI, Mueller H, et al. Hepatitis B virus X protein stimulates gene expression selectively from extrachromosomal DNA templates. *Hepatology* 2012 ; 56 : 2116-24.

NOUVELLE

Défaillances cardiaques d'origine mitochondriale Une question de régime ?

Paule Bénit, Pierre Rustin

Inserm UMR1141, Hôpital Robert Debré, 48, boulevard Sérurier, 75019 Paris, France. pierre.rustin@inserm.fr

> La structure fluide du réseau mitochondrial permet d'assurer, de façon spécifique en tous points de la cellule, les nombreuses fonctions métaboliques et la production d'ATP. À tout moment, la structure de ce réseau dépend de l'équilibre entre phénomènes de fusion et de fission des mitochondries, contrôlés par une série de protéines dont on commence à découvrir l'importance dans divers processus physiologiques et pathologiques [1-4] (→).

(→) Voir les Synthèses de C. Sauvanet et al., m/s n° 10, octobre 2010, page 823 et de E. Sarzi et A. Rötig, m/s n° 2, février 2010, page 171

Il a ainsi été montré que la maturation anormale de la protéine OPA1 (*optic atrophy 1*, une guanosine triphosphatase de type dynamine) et la fragmentation mitochondriale qu'elle entraîne sont à l'origine d'une

insuffisance cardiaque chez la souris [5]. Cette démonstration est basée sur l'utilisation de cinq modèles murins caractérisés par la délétion homozygote de l'un ou des deux (double mutant) gènes codant les protéases YME1L (*i-AAA protease*) et OMA1 (*IM peptidase*), toutes deux connues pour réguler la protéolyse de la protéine OPA1 [6]. Cette délétion conditionnelle est soit ubiquitaire, touchant tout l'organisme, soit spécifique du tissu cardiaque ou du muscle squelettique, soit encore simultanée dans ces deux tissus.

Un rôle vital pour la protéase YME1L qui contrôle le devenir de la protéine OPA1, un facteur clé de la morphologie mitochondriale

Initialement, grâce à l'utilisation d'une lignée de souris exprimant une Cre

recombinase¹ sous le contrôle du promoteur ubiquitaire de l'actine- β , une délétion homozygote soit d'*Yme1l*, soit d'*Oma1*, a été d'abord obtenue dans tous les tissus. Alors que les souris *Oma1*^{-/-} naissent suivant les lois de Mendel, aucune souris *Yme1l*^{-/-} n'est viable. De fait, dès le stade E 8,5², les embryons *Yme1l*^{-/-} montrent un retard de croissance spectaculaire et présentent des battements cardiaques altérés. Aucune souris homozygote *Yme1l*^{-/-} n'est obtenue au-delà d'E 13,5 soulignant le rôle vital d'YME1L.

¹ Le système de recombinaison Cre-Lox utilise l'enzyme recombinase Cre, une tyrosine recombinase issue du bactériophage P1, afin de cibler des séquences loxP (également issues du bactériophage P1), permettant ainsi d'activer, réprimer, voire même échanger, les gènes situés entre les séquences lox.

² Correspondant au jour 8,5 de développement embryonnaire.