



Armand-Frappier Santé Biotechnologie

CARACTÉRISATION DE L'AUTOPHAGIE ET DE LA SÉCRÉTION DES EXOSOMES LORS DE LA RÉPLICATION DU VIRUS D'HÉPATITE DELTA (VHD)

Par

Marwa Khabir

Thèse présentée pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D) en sciences de Virologie et Immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury et Examinateur interne	Maritza Jaramillo INRS- Armand-Frappier Santé Biotechnologie
Examinateur externe	Carolina Alfieri Département de microbiologie, infectiologie et immunologie Université de Montréal
Examinateur interne	Guy Lemay Département de microbiologie, infectiologie et immunologie Université de Montréal
Directeur de recherche	Patrick Labonté
Codirecteur de recherche	Matthieu Blanchet

© Droits réservés de Marwa Khabir, Juin 2020

« Une personne qui n'a jamais commis d'erreurs n'a jamais tenté d'innover »

Albert Eistein

REMERCIEMENTS

Je voudrais dans un premier temps remercier les membres du jury de l'honneur qu'ils me font en acceptant d'examiner ce travail. Un remerciement particulier à Maritza Jaramillo, de présider ce jury de thèse, tout comme à Carolina Alfieri et Guy Lemay pour m'avoir aimablement offert de leur temps précieux pour commenter mes travaux.

Je tiens à remercier grandement mon directeur de recherche Patrick Labonté, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Il m'a offert l'opportunité d'approfondir mes connaissances scientifiques et pour m'avoir permis de grandir en tant que chercheur. Je le remercie pour sa gentillesse, sa patience et sa disponibilité tout au long des années de ma thèse. Patrick était toujours à l'écoute des soucis expérimentaux pour me conseiller et me soutenir au cours de l'élaboration de mon projet de doctorat.

Je reconnais avec gratitude l'aide de mon co-directeur de recherche Matthieu Blanchet, pour son mentorat et sa collaboration continus, pour m'avoir orienté dans l'organisation et la meilleure planification de mes objectifs lors de la réalisation de mes projets. Merci également de m'avoir fait bénéficier de sa grande compétence, et il a su me transmettre sa rigueur scientifique et son enthousiasme communicatif.

Je tiens à remercier également nos collaborateurs, Pr Camille Sureau, Pr Bukong, Terence Ndonyi et Pr Julien Van Grevenynghe pour les précieux conseils scientifiques.

Je tiens aussi à remercier mes collègues de laboratoire pour leur support: Quoc Tuan Le, pour avoir fourni les protocoles de démarrage de mon premier projet. Ahmed Fahmy, pour ses discussions et conseils pertinents au cours des expériences pratiques. Vigigah Sinnathamby pour les moments agréables qu'on a passés ensemble dans le laboratoire. Richard Boulon, pour sa bonne humeur contagieuse, et pour sa relecture enrichissante de cette thèse. Léna Angelo pour les discussions enrichissantes. Je remercie toute l'équipe pour les bons moments passés ensemble.

La recherche est une aventure humaine, merci à tous les collègues qui m'ont accordé un peu de cette humanité en m'offrant de leurs temps et de leur attention comme Mostafa, Mohamed, Hamza, Hicham, Monther, Clément, Wesley, Aicha, Xavier, Ebtissem, Jingjin. Un remerciement à Steven Laplante et aux collègues et membres de son laboratoire, notamment ceux avec qui j'ai eu l'occasion de travailler Fatma et Marwa. Je remercie aussi mes stagiaires les deux Audrey, Asma, Nasim, Tania, Sabrina, Marie et les apprentis du programme de biosciences pour leur participation à mes travaux.

Un grand merci pour mes amis de l'IAF, Slimane, Ahlem, Yosra, Asma, Maha, Mohamed, Ghezlen, Sara, Raafet, pour leur bienveillance et pour leur soutien. Amina Barakati, ma confidente qui a su m'épauler lorsqu'il y'en avait besoin, et pour mes précieuses amies : Hajer et Soumia pour leur encouragement et leur présence chaleureuse. La liste de mes ami(e)s de l'IAF est assez longue, peut être au moment d'écrire j'oublie à nommer une ou plusieurs personnes mais je suis très reconnaissante à chaque personne qui m'a aidé de près ou de loin durant ces années de doctorat. Merci à mon amie Raoua, parfois lointaine, mais finalement bien présente par son écoute et son aide.

Je me dois également de souligner la contribution de nombreuses personnes de près ou de loin à ce travail : À Jessy Tremblay pour ses nombreux conseils et son aide si précieux à la cytométrie en flux et la microscopie confocale et pour toutes les discussions scientifiques et générales très enrichissantes. À Michel Courcelles pour ses services uniques durant la recherche bibliographique. À Anne Philippon pour son assistance dans les démarches administratives, pour son enthousiasme et sa gentillesse et à Josette Bourdages à l'accueil si chaleureux et enfin tous les collaborateurs administratifs.

Merci également au Ministère de la recherche de la Tunisie qui en allouant la bourse d'étude m'a permis d'étudier au Québec et vivre cette expérience enrichissante sur le plan professionnel que personnel.

A titre plus personnel, je remercie chaleureusement mon époux, Naoufel, pour son enthousiasme contagieux à l'égard de mes travaux comme de la vie en général. Je tiens à le remercier surtout pour son support ininterrompu et ses nombreux conseils tout le long de ma thèse. Aucun mot exprimera ma gratitude.

Rien de tout cela ne serait arrivé si je n'avais pas eu le soutien de mes chers parents, Ibrahim et Fatma. Merci pour votre présence malgré les kilomètres qui nous séparent dans la vie de tous les jours, vous m'avez donné la force, l'énergie, et je vous serai éternellement reconnaissante de votre amour inconditionnel. Je vous dédie cette thèse, à vous et en mémoire de mon grand-père.

Un énorme merci pour l'aide de mes proches ici au Québec, et en particulier mon oncle Ahmed et sa famille, qui m'ont chaleureusement accueillie et m'ont facilité beaucoup des tâches durant mon parcours, et la présence chaleureuse de mon oncle Abdallah et sa famille.

Un grand merci à ma famille et mes proches présents en Tunisie, ou ailleurs, avec cette question récurrente, « quand est-ce que tu la soutiens cette thèse ? », bien qu'angoissante en période fréquente de doutes, m'ont permis de ne jamais dévier de mon objectif final. Ma grandmère, mes frères, ma sœur, mes cousines et ma belle-famille, je n'oublierai jamais vos encouragements et votre soutien moral.

RÉSUMÉ

Le virus de l'hépatite B (VHB) est le principal agent étiologique responsable du cancer du foie à travers le monde. Actuellement, il est estimé que 257 millions d'individus sont chroniquement infectés par ce virus. Parmi ces individus, 17 millions sont également porteurs du virus de l'hépatite delta (VHD). Le VHD est un virus satellite qui requiert le VHB pour compléter son cycle de réplication. Une co-infection par les VHB et VHD aggrave significativement les risques de complications hépatiques chez les patients. Par conséquent, il est crucial de comprendre les facteurs de l'hôte qui favorisent la réplication de ces virus et l'établissement de leur chronicité. L'infection virale provoque un stress cellulaire qui pourrait induire différents processus biologiques tels que l'autophagie et la sécrétion des exosomes.

Dans une première partie, nous avons analysé l'impact de la réplication de VHB et VHD sur l'autophagie. Nous avons étudié l'implication du processus autophagique dans le cycle de réplication du VHD en cas de mono-expression ou de co-expression avec le VHB. Nos résultats montrent que les protéines HBx et S-AgHBs induisent l'autophagie. De plus, les deux isoformes de l'antigène delta (AgHD), S-AgHD et L-AgHD, provoquent l'accumulation des autophagosomes et perturbent le flux autophagique. Nous avons exploité la technologie « CRISPR-Cas9 » pour générer des cellules « *knockout* » pour différents gènes autophagiques. Nos résultats montrent que la machinerie autophagique, spécifiquement les protéines impliquées dans les étapes d'élongation des autophagosomes, soit ATG7, ATG5 et LC3, est importante pour la sécrétion des virions du VHB. Cependant, la réplication intracellulaire du génome du VHB n'est pas affectée. Il est intéressant de noter que l'inhibition d'expression d'ATG5 provoque une diminution du niveau d'ARN viral intracellulaire du VHD. En revanche, dans les mêmes conditions, nous n'avons pas observé un effet additionnel sur la sécrétion du VHD (cette étude a été publiée dans « Journal of Virology »).

Dans une seconde partie, nous avons étudié la possible transmission du VHD, indépendante du VHB, à travers les exosomes. Ainsi, nos résultats montrent que l'expression de protéines du VHD seules ou en association avec l'ARN du VHD (RNP) provoque une augmentation de la concentration des vésicules extracellulaires. De plus, nous avons constaté que les exosomes isolés des cellules qui expriment la ribonucléoprotéine, la S-AgHD et la L-AgHD contiennent l'AgHD sous les deux isoformes. Il était intéressant de montrer que les cellules Huh7 naïves incubées avec des exosomes purifiés de cellules qui expriment la ribonucléoprotéine accumulent l'ARN viral du VHD dans la cellule.

En conclusion, d'une part, nous avons mis en évidence que les deux virus VHB et VHD profitent de la machinerie autophagique pour assurer leurs cycles de réplication. D'autre part, nous avons découvert que les composantes virales du VHD se retrouvent dans les exosomes. Par conséquent, le VHD pourrait propager entre les hépatocytes en absence du VHB et il pourrait aussi propager dans les PBMCs pour moduler la réponse immunitaire.

Mots clés : VHD ; VHB ; autophagie ; exosomes

ABSTRACT

The hepatitis B virus (HBV) is the main etiological agent responsible for liver cancer worldwide. Currently, it is estimated that 257 million people are chronically infected with this virus. Among those people, 17 million are also carriers of the hepatitis Delta virus (HDV). The HDV is a satellite virus that requires HBV to complete its replication cycle. Co-infection with HBV and HDV increases significantly the risk of liver complications in patients. Therefore, it is crucial to understand the host factors that promote the replication of these viruses and the establishment of their persistence. The viral infection causes cellular stress which could induce various cellular processes such as autophagy and the secretion of exosomes.

In the first part, we analyzed the impact of HBV and HDV replication on autophagy. We studied the implication of the autophagic process in the replication cycle of HDV in case of monoexpression or co-expression with HBV. Our results show that HBV proteins HBx and S-HBsAg induce autophagy. In addition, the two isoforms of the delta antigen (HDAg), S-HDAg and L-HDAg, cause the accumulation of autophagosomes and disrupt the autophagic flux. We exploited «CRISPR-Cas9» technology to generate *«knockout»* cells for different autophagic genes. Our results show that the autophagic machinery, specifically the proteins involved in the stage of elongation of the autophagosomes, namely ATG7, ATG5 and LC3, are important for the secretion of HBV virions. However, intracellular replication of the HBV genome is not affected. Interestingly, inhibition of ATG5 expression causes a decrease in the level of intracellular HDV RNA in our cell model. However, under the same conditions, we did not observe an additional effect on the secretion of HDV (This study was published in «Journal of Virology»).

In the second part, we studied the putative transmission of HDV, independent of HBV, through exosomes. Our results show that the expression of HDV proteins, only or on association with the HDV RNA (RNP) causes an increase in the concentration of secreted extracellular vesicles. In addition, we found that exosomes isolated from cells that express HDV proteins (S-HDAg and L-HDAg) separately or on association with HDV RNA (RNP) harbor the two isoforms of HDAg. It was interesting to show that naïve Huh7 cells incubated with purified exosomes from cells that express RNP accumulate the viral RNA of HDV within the cell.

In conclusion, on the one hand, we have highlighted that the two HBV and HDV viruses take advantage of the autophagic machinery to ensure their replication cycles. On the other hand, we discovered that the viral HDV components are found in the exosomes. Therefore, HDV could propagate to other hepatocytes in the absence of HBV or it could enter PBMCs cells to modulate the immune response.

Keywords: HDV; HBV; autophagy; exosomes

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ	V
ABSTRACT	VI
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES TABLEAUX	XII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIII
CHAPITRE 1: INTRODUCTION	1
1 LE VIRUS DE L'HÉPATITE B	2
1.1 Historique	2
1.2 Transmission et Épidémiologie du VHB	2
1.3 Classification du VHB	3
1.4 Pathogenèse du VHB	4
1.5 Structure des particules virales	6
1.5.1 Particule de Dane	6
1.5.2 Particules sous virales sphériques et filamenteuses	7
1.6 Le génome du VHB	8
1.7 Les protéines du VHB	
1.7.1 Protéines d'enveloppe	10
1.8 Le cycle de réplication du VHB	
2 LE VIRUS DE L'HÉPATITE DELTA	18
2.1 Historique	18
2.2 Épidémiologie	
2.3 Classification	
2.4 Pathogenèse du VHD	21

2.5 Morphologie des virions et le génome du VHD	21
2.6 L'antigène delta	22
2.7 Cycle de réplication du VHD	25
2.7.1 Entrée	26
2.7.2 Réplication	26
2.7.3 Assemblage et sécrétion	27
3 CONSÉQUENCES DES CO-INFECTION ET SURINFECTION PAR	LE
VHB ET LE VHD	29
4 TRAITEMENTS	30
4.1 Traitements anti-VHB	30
4.2 Traitements anti-VHD	32
5 LES MODÈLES CELLULAIRES	33
5.1 Cultures primaires d'hépatocytes	33
5.1.1 Hépatocytes Humains	33
5.1.2 Hépatocytes de Tupaïa	34
5.2 Lignées cellulaires hépatiques	34
6 L'AUTOPHAGIE	36
6.1 Découverte et définition	36
6.2 Machinerie de l'autophagie	38
6.2.1 Initiation de l'autophagie	38
6.2.2 Élongation du phagophore	39
6.2.3 Maturation des autophagosomes	40
6.2.4 Dégradation sélective	40
7 L'AUTOPHAGIE ET LES VIRUS	42
7.1 Mécanismes d'induction de l'autophagie par les virus	42
7.1.1 Induction indirecte de l'autophagie par le stress du réticulum endoplasmique.	42
7.1.2 Induction directe de l'autophagie par des protéines virales	43
7.2 Le rôle antiviral de l'autophagie	43
7.2.1 Virophagie	43

7.2.2 Induction de réponses immunitaires innée et adaptative	45
8 NEUTRALISATION DE L'AUTOPHAGIE ET AUTOPHAGIE	
PROVIRALE	
8.1 Echappement de la dégradation par l'autophagie	
8.1.1 Inhibition de l'initiation de l'autophagie	
8.1.2 Inhibition de la maturation des autophagosomes	
8.2 Détournement de l'autophagie au profit des virus	
8.3 L'Autophagie et le VHB	51
9 LES VÉSICULES EXTRACELLULAIRES	57
9.1 Les exosomes	57
9.1.1 Définition et historique	57
9.1.2 Fonctions biologiques des exosomes	59
9.1.3 Biogenèse et absorption des exosomes	60
9.2 Les exosomes et les virus	63
9.2.1 Le rôle antiviral des exosomes	64
9.2.2 Le rôle proviral des exosomes	64
9.3 Les exosomes et le VHB	
10 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE	69
CHAPITRE 2: PREMIÈRE PUBLICATION	72
CHAPITRE 3: DEUXIÈME PUBLICATION	92
CHAPITRE 4: DISCUSSION GÉNÉRALE	132
11 IMPLICATION DE L'AUTOPHAGIE DANS LE CYCLE DE	
RÉPLICATION DU VHB ET DU VHD	133
11.1 Implication de l'autophagie dans le cycle de réplication du VHB	133
11.2 Implication de l'autophagie dans le cycle de réplication du VHD	135
11.3 L'effet de l'autophagie dans les cellules hépatiques expri	mant
simultanément les deux virus (VHB et VHD)	140

12 LES EXOSOMES POURRAIENT ÊTRE DES INTERMÉDIAIRES DE	:
TRANSMISSION DU VHD ENTRE LES CELLULES HÉPATIQUES	141
13 MODÈLE PROPOSÉ	145
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	148
LISTE DES RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUES	152
LISTE DE PUBLICATIONS	193
ANNEXE	194

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Image de microscopie électronique et représentation schématique des particules virales
Figure 1.2 : Représentation schématique du génome du VHB9
Figure 1.3 : Transcription et expression des protéines de surface du VHB12
Figure 1.4: Représentation schématique du cycle de réplication du VHB13
Figure 1.5: Répartition géographique mondiale des VHB et VHD selon leurs génotypes
Figure 1.6: Structure du VHD 22
Figure 1.7: Mécanisme d'édition d'ARN du VHD23
Figure 1.8: Isoformes de l'antigène delta25
Figure 1.9: Cycle de réplication du VHD28
Figure 1.10: Processus de l'autophagie canonique37
Figure 1.11: Le rôle antiviral de l'autophagie 44
Figure 1.12: Autophagie et réponse immunitaire innée et adaptative
Figure 1.13: Rôle proviral de l'autophagie51
Figure 1.14: Induction de l'autophagie par la protéine S-AgHBs et la protéine HBx du VHB55
Figure 1.15: Représentation schématique des vésicules extracellulaires
Figure 1.16: Représentation schématique de la sécrétion des exosomes dans le milieu extracellulaire
Figure 1.17 : Biogenèse des exosomes61
Figure 1.18: Absorption des exosomes par la cellule réceptrice63
Figure 1.19: Exosomes et Virus
Figure 4.1: Outil d'analyse de flux autophagique par la construction mTagRFPmWasabi
Figure 4.2: Colocalisation de la RNP du VHD et la protéine autophagique ATG16L1140
Figure 4.3: L'autophagie et la sécrétion d'exosomes favoriserait la propagation du VHD indépendamment du VHB147

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Les virus de la famille des Hepadnav	iridae3
--	---------

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- ADNccc : ADN circulaire double brin super enrôlé
- ADN-rc : ADN circulaire et relâché
- AgAu : Antigène Australia
- AgHBe : Antigène « e » du VHB
- AgHBs : Antigène de surface du VHB
- AgHD : Antigène delta du VHD
- AIF : Apoptosis-Inducing Factor
- ALIX : ALG-2 Interacting Protein X
- AMPK : AMP-activated protein kinase
- ARNpg : ARN prégénomique
- ATF6 : Activated Transcription Factor 6
- ATG : Autophagy related genes
- BCL2 : B cell lymphoma-2
- CHC : Carcinome Hépato-Cellulaire
- CMH : Complexes Majeurs d'Histocompatibilité
- ESCRT : Endosomal Sorting Complexes Required for Transport
- HBc : Protéine de la capside du VHB
- HBx : protéine X du VHB
- Hsc70 : Protéine de choc thermique de 70 kDa
- HSPGs : Protéoglycanes de Sulfate d'Héparine
- HOPS: Homotypic fusion and vacuole protein sorting
- ILVs : Vésicules Intraluminales
- IRE1 : Inositol Requiring Enzyme 1a

- LC3 : Microtubule-associated protein light chain 3
- MBV : Corps Multi-Vésiculaires
- MDA5 : Melanoma differentiation-associated protein 5
- mTORC1 : Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1
- MyD88 : Myeloid differentiation primary response protein
- NTCP : Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide
- **ORF** : Open Reading Frame
- PAMPs: Pathogen Associated Molecular Patterns
- PE : Phosphatidyléthanolamine
- PERK : Protein kinase RNA (PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase
- PI3KCIII : Complexe Phosphatidylinositol-3-Kinase Classe 3
- PI3P : PhosphatidyIInositoI-3-Phosphate
- PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
- PKR : double-stranded RNA dependent Protein Kinase
- PLEKHM1 : Pleckstrin homology domain containing protein family member 1
- **PSV** : Particules Sous Virales
- RE : Réticulum Endoplasmique
- RIG-I : Retinoic acid-inducible gene-I-like receptors
- RNP : Ribonucléoprotéine
- SNARE : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors
- Tat:Trans-Activator of Transcription
- TRIF : TIR domain-containing adaptor molecule 1
- TSG101 : Tumor susceptibility gene 101
- ULK1 : Unc-51-like kinase 1
- VHB : Virus d'Hépatite B
- VHD : Virus de l'Hépatite delta

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

1 LE VIRUS DE L'HÉPATITE B

1.1 Historique

En 1965, Baruch Samuel Blumberg et son collaborateur Harvey Alter ont découvert la présence d'un nouvel antigène dans de nombreux échantillons parmi une collection de sérums. Cet antigène était fréquemment observé dans les sérums d'aborigènes australiens. Par conséquent il était appelée l'antigène Australia (AgAu) (Blumberg *et al.*, 1966). Au début, Blumberg a cru que l'AgAu était une protéine sérique polymorphique. Plus tard, différentes évidences ont permis à Blumberg d'établir une corrélation directe entre la présence de l'AgAu et l'infection par le virus d'hépatite B (VHB). Cette corrélation a été confirmée par des travaux d'autres équipes qui ont confirmé que l'AgAu est un marqueur de l'hépatite B aiguë ou chronique et qui peut être présent même chez des porteurs sains (Prince, 1968). En 1970, par microscopie électronique, Dane et son équipe ont découvert la présence d'une particule de 42 nm de diamètre en plus de l'AgAu. Cette particule est connue aujourd'hui sous le nom «particule de Dane» et constitue la particule infectieuse du VHB (Dane *et al.*, 1970). L'AgAu est aujourd'hui connu sous le terme d'antigène de surface du VHB (AgHBs) (Gerlich, 2013).

En 1974, il fut démontré que le génome viral était constitué d'ADN (Robinson *et al.*, 1974) et celui-ci fut séquencé en 1978 par trois différentes équipes qui sont, Pierre Tiollais (Paris), William Rutter (San Francisco) et Kenneth Murray (Edinburgh) (Charnay *et al.*, 1979; Pasek *et al.*, 1979; Valenzuela *et al.*, 1979).

1.2 Transmission et Épidémiologie du VHB

La transmission du VHB se fait généralement par voie parentérale verticale (périnatale) de la mère à l'enfant, ou horizontale par le biais de sang contaminé à la suite d'une piqûre avec une aiguille contaminée (utilisateurs de drogue par intraveineuse, le tatouage, le piercing), et l'exposition au sang ou à d'autres fluides corporels infectés tels que la salive et les sécrétions vaginales (World Health Organisation, 2019b). Chez un patient adulte, l'infection devient chronique dans seulement 5% des cas. Cependant, l'infection durant l'enfance peut engendrer une infection chronique dans 95% des cas (World Health Organisation, 2019b). Selon l'Organisation mondiale de la Santé, la prévalence du VHB la plus élevée est observée dans la région pacifique occidentale (6,2% des adultes infectés) et en Afrique (6,1% des adultes infectés)

(World Health Organisation, 2019b). Le pourcentage de la population infectée par le VHB est de 3,3% dans la région de la méditerranée orientale. Il est de 2% dans la région de l'Asie du Sud-Est. Cependant, il est de 1,6% en Europe et de 0,7% en Amérique du Sud et Amérique du Nord (World Health Organisation, 2019b) (Figure 1.5A).

Au Canada, l'hépatite B est une maladie à déclaration obligatoire (Gouvernement du Canada, 2020) avec un taux de cas déclarés d'infection aiguë en 2017 de 0,5 par 100.000 habitants (Gouvernement de canada 2017). Il a été noté que durant la période entre 2005 et 2013 ce taux a diminué de 1 à 0,5 par 100.000 habitants. Également, le taux global d'hépatite B chronique a diminué de 13,6 à 12 par 100.000 habitants pour la période entre 2009 et 2013. Ces améliorations sont dues principalement à l'implantation d'un programme de vaccination universelle dans tout le territoire canadien depuis le début des années 1990 (Coffin *et al.*, 2018; Delage & Carter, 1992)

1.3 Classification du VHB

CHBV

Le VHB appartient à la famille des *Hepadnaviridae*. Selon l'espèce hôte du virus et les différences phylogénétiques, cette dernière se scinde en deux genres. Le genre des *orthohepadnavirus* qui infectent les mammifères et le genre des *avihepadnavirus* qui infectent les oiseaux (Dandri & Peterson, 2018) (Tableau 1.1).

Virus	Hôte naturel	Genre	
HBV	Humain		
WHV	Marmotte américaine	Orthoborodrovirus	
GSHV	Écureuil fouisseur	Orthonepadnavirus	
ASHV	Écureuil arctique		
WMHBV	Singe Laineux		
DHBV	Canard de Pékin		
HHBV	Héron cendré	Avibonadnavirus	
SGHBV	Oie de Ross et Oie des neiges	Avinepaunavirus	
STHBV	Cigogne		

	Tableau 1.1	: Les virus	de la famille des	Hepadnaviridae
--	-------------	-------------	-------------------	----------------

Gruidés

De plus, trois espèces d'*hepadnavirus* apparentées antigéniquement au VHB humain ont été identifiées chez les chauves-souris. Ces virus sont également capables d'infecter les hépatocytes humains (Drexler *et al.*, 2013).

1.4 Pathogenèse du VHB

Le VHB peut entraîner une infection aiguë ou une infection chronique. Lors d'une infection chronique, le virus est alors l'agent étiologique de maladies hépatiques de sévérités diverses allant de l'hépatite chronique jusqu'à la cirrhose et au carcinome hépato-cellulaire (CHC).

- Infection aiguë : c'est une infection considérée généralement bénigne. Dans la plupart des cas, plus particulièrement chez les enfants, l'infection aiguë est asymptomatique. Le diagnostic d'une infection primaire est basé sur la détection de l'AgHBs dans le sérum du patient après une période d'incubation de 4 à 10 semaines. La virémie est généralement importante (10⁹ à 10¹⁰ virions par ml) (Ribeiro *et al.*, 2002). L'AgHBs persiste pour 1-5 mois, puis commence à disparaître accompagné par une amélioration et résolution des signes cliniques. Une fois guéri, le patient développe des anticorps anti-HBs qui sont considérés des marqueurs fiables de guérison et de développement de l'immunité (Hoofnagle, 1981). Le système immunitaire produit aussi une quantité élevée d'anticorps anti-HBc (protéine de la capside) (Hoofnagle, 1981). Il est important de mentionner que dans le cas d'infection résolutive caractérisée par la disparition des marqueurs viraux et l'apparition des anticorps (anti-HBs, anti-HBc), des traces d'ADN viral sont détectables dans le sang par PCR pendant plusieurs années, même à vie (Prince *et al.*, 2001). Dans 1% à 5% des cas, les patients adultes avec une infection aiguë développent une infection chronique (Likhitsup & Lok, 2019).
- Infection chronique: l'infection par le VHB est considérée chronique quand l'AgHBs persiste dans le sérum du patient pendant 6 mois ou plus (Seeger & Mason, 2000). Le risque de développer une infection chronique dépend principalement de l'âge auquel l'infection est survenue. En effet, chez le nouveau-né la chronicité est systématique, alors que pour un enfant âgé entre 1 et 4 ans, la probabilité de la chronicité est de 30 %. Cependant, elle est de 1% à 5 % pour les adultes (Lamontagne *et al.*, 2016; Martinot-Peignoux *et al.*, 2002; McMahon *et al.*, 1985). Chaque patient infecté chroniquement par le VHB peut avoir des manifestations cliniques différentes. Ainsi l'infection chronique peut avoir différentes phases cliniques. Ces dernières sont les suivantes :

- Tolérance immunitaire : caractérisée par un titre élevé d'ADN viral, détection de l'AgHBe (Antigène « e » du VHB) et l'AgHBs et un niveau normal d'alanine aminotransférase (ALAT) (Li *et al.*, 2020a; Likhitsup & Lok, 2019).
- Clairance immunitaire : le titre d'ADN viral est assez variable (élevé, faible, à non détectable). Cette phase est caractérisée par la détection d'une inflammation et la présence de l'AgHBe. L'apparition de l'anticorps anti-HBe durant cette phase est associée à une diminution de risque de développer une cirrhose ou un carcinome hépato-cellulaire (Liaw, 2009).
- Porteur inactif d'AgHBs : cette phase est définie par une présence élevée d'anti-HBe accompagnée par une disparition de l'AgHBe. De plus, elle est caractérisée par une séroconversion de l'AgHBs en anti-HBs et un niveau très faible presque non détectable de niveau sérique d'ADN viral. Cette phase est associée à une évolution clinique favorable et peut durer indéfiniment. Elle peut, chez certains individus, aboutir à une phase de réactivation (Lamontagne *et al.*, 2016; Yim & Lok, 2006).
- Réactivation : la réplication virale du VHB reprend soit spontanément, soit à la suite d'une suppression immunitaire (Yim & Lok, 2006). La réactivation est divisée en trois phases. La première phase est l'initiation de la réactivation suivie par une augmentation soudaine de la réplication du VHB dans le cas de chimiothérapie ou après un traitement avec un immunosuppresseur. La quantité d'ADN du VHB dans le sérum augmente 10 fois par rapport le niveau basal (Guo *et al.*, 2018). De plus, l'AgHBe peut être redétecté chez les patients AgHBe négatif (Guo *et al.*, 2018). La deuxième phase commence suite à une diminution de la quantité administrée de l'immunosuppresseur ou un arrêt de traitement et elle est caractérisée par une augmentation significative de niveau d'ALAT alors que l'ADN viral sérique commence à diminuer (Guo *et al.*, 2018). La troisième phase correspond à la période de rétablissement durant laquelle l'ADN viral attient le niveau basal (Hoofnagle, 2009). Sur le plan clinique, les patients pendant la phase de réactivation ne vont pas forcement expérimenter un ordre séquentiel de ces trois phases (Hoofnagle, 2009).

L'infection au VHB engendre non seulement une infection aiguë ou chronique, mais elle est considérée comme un facteur important de développement de cirrhose et de carcinome hépatocellulaire. En effet, en absence de traitement antiviral, le taux d'incidence annuel du

5

développement de cirrhose est de 2% à 6% chez les patients AgHBe positifs et de 8% à 10% chez les patients AgHBe négatifs (Likhitsup & Lok, 2019). Le risque annuel de développer un carcinome hépato-cellulaire est de 2% à 5% chez les patients ayant une cirrhose alors qu'il est inférieur à 1% chez les patients sans cirrhose (Fattovich *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2020a; Likhitsup & Lok, 2019)

• Carcinome hépatocellulaire :

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est considéré le sixième cancer le plus répandu (Chaturvedi *et al.*, 2019) et la quatrième cause de décès parmi tous les cancers dans le monde avec 782,000 décès pour 2018 (Bray *et al.*, 2018; Rawla *et al.*, 2018). Il est estimé que le nombre de décès, incluant les deux sexes et tous les groupes d'âge, lié au cancer du foie atteindra 1,284,252 pour l'année 2040 (Rawla *et al.*, 2018). Le risque de développer un CHC pour un patient chroniquement infecté par le VHB est 100 fois plus élevé que pour le sujet non infecté (Beasley, 1988; Budzinska *et al.*, 2018). Les mécanismes moléculaires et cellulaires qui conduisent au CHC restent peu connus, cependant plusieurs facteurs ont été proposés. Ces facteurs consistent en la régénération cellulaire massive suite à la destruction des hépatocytes, l'intégration d'ADN viral du VHB dans le génome de la cellule hôte et des facteurs viraux tels que la protéine X (HBx) (Lamontagne *et al.*, 2016).

1.5 Structure des particules virales

Le VHB a une capacité à former plusieurs types de particules virales y compris les particules de Dane (Dane *et al.*, 1970) (virions matures infectieux) et les particules sous virales (PSV) sphériques ou filamenteuses (Kaplan *et al.*, 1976) (Figure 1.1).

1.5.1 Particule de Dane

Les particules de Dane sont des particules de 42 nm de diamètre (Dane *et al.*, 1970) (Figure 1.1). Elles correspondent aux virions matures infectieux (Blumberg, 1977). Chez certains patients, la concentration peut atteindre 10¹⁰ virions par ml dans un sérum infectieux (Bruss, 2007). Ces particules sont formées :

D'une enveloppe lipoprotéique externe dans laquelle sont ancrées les trois protéines d'enveloppe du virus (Heermann *et al.*, 1984). Ces protéines jouent un rôle important dans la morphogenèse et l'infection du VHB (Bruss & Ganem, 1991; Bruss *et al.*, 1996; Bruss & Thomssen, 1994; Gripon *et al.*, 1995). Les trois protéines d'enveloppe sont toutes des

antigènes de surface du VHB (AgHBs) (Heermann *et al.*, 1984) et seront appelées dans la suite de ce document respectivement S-AgHBs, M-AgHBs et L-AgHBs (S pour « small », M pour « medium », et L pour « large ») (Figure 1.1) ;

- D'une nucléocapside icosaédrique qui a un diamètre de 27 nm (Figure 1.1) (Wei *et al.*, 1996);
- D'un génome viral associé de façon covalente à la polymérase virale (Figure 1.1) (Bartenschlager & Schaller, 1988; Gerlich & Robinson, 1980).

1.5.2 Particules sous virales sphériques et filamenteuses

Les particules sous virales (PSV) sont sécrétées sous forme sphérique ou filamenteuse. Ces particules ont le même diamètre de 22 nm, mais de longueur variable (Heermann *et al.*, 1984). Ces particules ne contiennent pas la nucléocapside du virus. Donc elles sont non infectieuses et sont composées des protéines de surface S-AgHBs, M-AgHBs et L-AgHBs du VHB (Bruss, 2007) (Figure 1.1).

Selon le modèle actuel, les particules sous virales filamenteuses seraient sécrétées, comme les virions du VHB, à travers les corps multi-vésiculaires (MVB) (Watanabe *et al.*, 2007). Alors que, les particules sous virales sphériques composées majoritairement de la S-AgHBs transitent par le ERGIC pour *«ER-Golgi intermediate compartment »* et sont secrétées à travers la voie de sécrétion classique (Jiang *et al.*, 2015). Il a été montré que la diminution drastique de la production des particules sous virales n'influence pas la sécrétion des particules infectieuses (particule de Dane) (Garcia *et al.*, 2009).

Dans le sérum des patients infectés par le VHB, les PSV sont de 1000 à 100000 fois plus abondantes que les virions (Chai *et al.*, 2008). La fonction biologique suggérée pour les PSV en excès est principalement d'ordre immunitaire. Ainsi, les PSV saturent le système immunitaire et empêchent la neutralisation des virions par les anticorps ce qui favorise la rencontre entre les virions et leur cellule cible (Chai *et al.*, 2008; Patient *et al.*, 2009; Prange, 2012).



Figure 1.1 : Image de microscopie électronique et représentation schématique des particules virales Les particules sous virales (sphériques et filamenteuses) et la particule infectieuse (particule de Dane) sont désignées. La particule de Dane est formée de l'enveloppe, composée de trois protéines d'enveloppe S, M et L, la nucléocapside et le génome qui est lié à la polymérase virale de façon covalente. Les particules sous virales représentent la fraction majeure des particules virales d'un sérum infectieux. Madame Lucifora m'as permis aimablement de mettre cette figure dans ma thèse (Lucifora, 2008)

1.6 Le génome du VHB

Le génome du VHB est extrêmement compact. En effet, l'une des singularités du VHB est que tous les cadres de lecture ouverts (ORF) se chevauchent et que tous les nucléotides du génome sont codants (Galibert *et al.*, 1979; Kassab, 2014). Le génome est composé d'un ADN circulaire de 3,2 kb partiellement double brin appelé ADN circulaire et relâché (ADN-rc) (Figure 1.2) (Seeger & Mason, 2000).

Le brin négatif de l'ADN-rc est complet et lié, par son extrémité 5', à la polymérase virale par un lien phosphotyrosine (Zoulim & Seeger, 1994). Le brin positif est incomplet et s'étend sur les 2/3 du génome avec une extrémité 3' de longueur variable (Delius *et al.*, 1983; Summers *et al.*, 1975) (Figure 1.2).



Figure 1.2 : Représentation schématique du génome du VHB La légende de la figure est présentée à droite du schéma du génome du VHB. Madame Lucifora m'as permis aimablement de mettre cette figure dans ma thèse (Lucifora, 2008).

Le génome du VHB est formé de 4 ORF codants pour 7 protéines virales :

- ORF Pré-S1/Pré-S2/S : contient 3 codons d'initiation ATG et code pour les 3 protéines d'enveloppe (L-AgHBs, M-AgHBs, S-AgHBs). Ces trois protéines partagent la même extrémité C-terminale, le domaine S (Figure 1.2) (Valenzuela *et al.*, 1979)
- ORF P : il est le plus long des ORF et recouvre 80% du génome. Il contient le gène codant pour la polymérase virale et chevauche au moins partiellement tous les autres ORF du virus (Figure 1.2) (Bartenschlager & Schaller, 1988; Bosch *et al.*, 1988).
- ORF Pré C/C : contient 2 codons d'initiation ATG permettant la synthèse de la protéine de la capside (AgHBc) et la protéine HBe (AgHBe) (Figure 1.2) (Pasek *et al.*, 1979; Takahashi *et al.*, 1980; Will *et al.*, 1987).
- ORF X : le plus petit des ORF code pour la protéine HBx (Figure 1.2) (Guo *et al.*, 1991; Rossner, 1992).

Il existe également des éléments de régulation de la transcription et de la réplication dans le génome viral (2 régulateurs de la transcription appelés « *Enhancer 1* » et « *Enhancer 2* », 4 promoteurs, un signal de polyadénylation unique utilisé pour l'ensemble des ARN du VHB, et un

signal d'encapsidation) (Antonucci & Rutter, 1989; Billet *et al.*, 1995; Junker-Niepmann *et al.*, 1990; Su & Yee, 1992; Yen, 1993) (Figure 1.2). De plus, les deux brins du génome viral possèdent deux séquences identiques répétées de 11 nucléotides nommées DR1 et DR2, pour « direct repeat » en position 1 et 2, respectivement (Figure 1.2). Elles sont impliquées dans la réplication du génome (Lien *et al.*, 1987; Molnar-Kimber *et al.*, 1984; Seeger *et al.*, 1986; Will *et al.*, 1987) et leur rôle sera détaillé plus loin.

- Les transcrits viraux du VHB :

Une fois dans le noyau de la cellule infectée, l'ADN-rc partiellement bicaténaire est réparé pour donner naissance à un ADN circulaire double brin super enroulé nommé l'ADNccc. Ce dernier sert de matrice pour la transcription des ARN viraux. Tous les transcrits générés sont coiffés et polyadénylés. Le génome du VHB contient un site unique de polyadénylation qui est utilisé pour tous les transcrits (Perfumo *et al.*, 1992; Simonsen & Levinson, 1983). On distingue 5 transcrits :

- Deux transcrits d'approximativement 3,5 kb incluant l'ARNpg et l'ARNpréC. L'ARNpg code pour l'AgHBc et la polymérase. L'ARNpréC code pour la protéine précore (précurseur de l'AgHBe sécrété). Ces deux ARN ont une extrémité 3' commune, mais diffèrent par leur extrémité 5', et sont par conséquent, de taille légèrement différente (Figure 1.2) (Billet *et al.*, 1995) ;
- Un transcrit de 2,4 kb codant pour la grande protéine de surface L-AgHBs (Figure 1.2) (Imazeki *et al.*, 1987; Valaydon & Locarnini, 2017; Yokosuka *et al.*, 1986);
- Un transcrit de 2,1 kb comportant des micro-hétérogénéités en 5' codant pour les protéines M-AgHBs et S-AgHBs (Figure 1.2 et 1.3) (Zhou & Yen, 1991) ;
- Un transcrit de 0,7 kb codant pour la protéine HBx (Figure 1.2) (Treinin & Laub, 1987).

1.7 Les protéines du VHB

1.7.1 Protéines d'enveloppe

Les protéines L-AgHBs, M-AgHBs et S-AgHBs constituent les trois protéines de surface du VHB (nommées aussi protéines d'enveloppe). Elles partagent toute la même extrémité C-terminale, mais diffèrent par leurs extrémités N-terminale. La protéine S-AgHBs est formée du seul domaine S, M-AgHBs est formée des domaines Pré-S2 et S, et L-AgHBs est formée des domaines Pré-S1, Pré-S2 et S (Figure 1.3). C'est au niveau de la membrane du réticulum

endoplasmique (RE) que ces protéines sont synthétisées. Les protéines M-AgHBs et S-AgHBs contiennent 4 domaines transmembranaires. Ces domaines sont insérés dans la membrane du RE. Alors que, l'extrémité N-terminale de la protéine L-AgHBs possède deux topologies membranaires distinctes. Sa région N-terminale est initialement localisée à la face cytoplasmique du RE et permet le recrutement des nucléocapsides du VHB. Il est estimé que par la suite, le domaine Pré-S est transloqué à ~50 % dans la lumière du RE et se retrouve à la surface des virions sécrétés (Bruss *et al.*, 1994). Cette topologie externe du domaine Pré-S est nécessaire pour l'interaction avec le récepteur cellulaire NTCP qui permet l'entrée dans la cellule hôte (Wu *et al.*, 2018; Yan *et al.*, 2012).

Les trois protéines d'enveloppe sont présentes dans différentes proportions dépendamment du type de particule du VHB. En effet, la protéine S-AgHBs est considérée comme étant présente en quantité majoritaire dans l'enveloppe des virions et des particules sous virales (Prange, 2012). Alors que la protéine L-AgHBs est exprimée principalement dans les virions et les particules filamenteuses (Neurath *et al.*, 1986). La protéine M-AgHBs est exprimée dans la même proportion pour toutes les différentes particules virales du VHB (Patient *et al.*, 2008).

Le domaine S des AgHBs est N-glycosylé au niveau du résidu asparagine 146 dans ~50% des cas. Cette glycosylation partielle semble due à un défaut d'accessibilité à la machinerie de glycosylation (Julithe *et al.*, 2014). La protéine S-AgHBs, formée du seul domaine S est nécessaire et suffisante pour la formation et la sécrétion spontanées des particules sous virales sphériques en absence de tous autres facteurs viraux (Dubois *et al.*, 1980; Moriarty *et al.*, 1981).

Le rôle de la protéine M-AgHBs dans le cycle viral du VHB n'est pas bien défini. Des études ont montré que cette protéine n'est pas nécessaire à la réplication, à la morphogenèse des virions, à la sécrétion et à l'infection *in vitro* et *in vivo* (Bruss & Ganem, 1991; Fernholz *et al.*, 1993; Fernholz *et al.*, 1991). Cependant, d'autres travaux *in vitro* ont montré que l'absence d'expression de la protéine M-AgHBs réduit la sécrétion des virions (Garcia *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2005; Patient *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2017).

De plus, l'étude de (Zhao *et al.*, 2017) a montré que la protéine cellulaire céruloplasmine interagit avec la M-AgHBs. Cette interaction provoque une diminution dans la production des virions extracellulaires. La céruloplasmine est principalement produite et secrétée par les hépatocytes, et elle est impliquée dans le métabolisme de fer (Yang *et al.*, 1990).

11



Figure 1.3 : Transcription et expression des protéines de surface du VHB

Les trois protéines de surface ou d'enveloppe du VHB (L-AgHBs, M-AgHBs et S-AgHBs) sont traduites à partir de deux ARNm différents : la L-AgHBs est codée par l'ARN sous-génomique de 2,4 kb initié par le promoteur preS1 ; La M-AgHBs et la S-AgHBs sont codées par l'ARN sous-génomique de 2,1 kb à microhétérogénéité 5' et initié par le promoteur preS2. Les trois protéines d'enveloppe partagent la même extrémité C-terminale, mais elles ont différentes extrémités N-terminale. D'où, la L-AgHBs contient les domaines preS1 + preS2 + S (389 ou 400 résidus d'acide aminé), la M-AgHBs contient les domaines preS2 + S (281 résidus d'acide aminé) et la S-AgHBs contient uniquement le domaine S (226 résidus d'acide aminé) Adapté de Wu *et al.*, 2018.

1.7.2 Protéine HBx

La protéine HBx issue du gène ORF X est la plus petite protéine du VHB. Elle a un poids moléculaire de 17 kDa. La HBx est une protéine non structurale et possède une activité transactivatrice. Elle module ainsi des gènes viraux et cellulaires (Slagle & Bouchard, 2016). Sa localisation dans la cellule n'étant pas bien délimitée, elle est détectée dans le cytoplasme et dans le noyau (Bouchard & Schneider, 2004). La protéine HBx est multifonctionnelle et son rôle dans la réplication du VHB a été confirmé *in vitro* et *in vivo* (*Slagle & Bouchard, 2016*). Elle est oncogénique ainsi elle participe au développement du CHC (Chaturvedi *et al.,* 2019). De plus elle a un rôle clé dans l'apoptose (Lamontagne *et al.,* 2016). Par ailleurs, comme discuté plus loin dans ce document (section 8.3), la protéine HBx est impliquée dans l'autophagie.

1.8 Le cycle de réplication du VHB

Le VHB infecte et se réplique dans les hépatocytes. Cependant, son ADN et son ARN ont été également détectés dans d'autres types cellulaires tels que les PBMCs, la moelle osseuse, le pancréas, les reins, la rate, le cœur, la peau ou encore les ovaires (Seeger & Mason, 2000).

Les étapes du cycle de réplication dans le foie sont présentées dans la figure ci-dessous et explicitées dans la légende (Figure 1.4).



Figure 1.4: Représentation schématique du cycle de réplication du VHB

Le schéma représente le cycle de réplication du VHB. (A) Attachement et entrée du VHB. (B) Adressage du génome au noyau. (C) Réparation du génome dans le noyau. (D) Transcription. (E) Formation des capsides du VHB. (F) Reverse transcription dans la capside néoformée. (G1) Assemblage des virions du VHB et des particules sous virale filamenteuses et bourgeonnement dans les "MVB", et (G2) bourgeonnent des particules sous virales sphériques dans la lumière du ERGIC. (H) Sécrétions des particules sous virales et des virions (particules de Dane) du VHB. HSPG, heparan sulfate proteoglycan's; NTCP, *Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide*; LHB, L-HBsAg; MHB, M-HBsAg; SHB, S-HBsAg; ER, endoplasmic réticulum; ERGIC, ER-Golgi intermediate compartment. Tiré de Morikawa *et al.*, 2016.

• Fixation et entrée :

L'entrée du VHB commence par la fixation, de facon non spécifique, aux protéoglycanes de sulfate d'héparine (HSPGs) sur la surface de la cellule hôte. Cette étape permet l'enrichissement de la membrane cellulaire en virions avant d'être internalisée par endocytose (Abou-Jaoudé & Sureau, 2007; Morikawa et al., 2016; Sureau & Salisse, 2013). Cette étape ne suffit pas pour l'entrée du virus puisqu'une interaction à un récepteur fonctionnel et spécifique est nécessaire. En 2012, ce récepteur, le NTCP « Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide », a été découvert (Yan et al., 2012). Le NTCP est enrichi dans les cellules hépatiques et sa principale fonction physiologique dans la cellule est la circulation d'acide biliaire dans l'organisme (Yan et al., 2012). La séquence N-terminale myristoylée du domaine Pré-S1 de la L-AgHBs interagit avec le domaine de liaison des acides biliaires (Yan et al., 2012) (Figure 1.4). Suite à la liaison aux récepteurs cellulaires, les virions du VHB entrent par endocytose clathrine-dépendante dans les cellules immortalisées dérivées de PHH (Primary Human Hepatocytes) dite HuS-E/2 (Huang et al., 2012) et les cellules HepG2 surexprimant leNTCP (Herrscher et al., 2020) et par endocytose cavéoline-dépendante dans les cellules HepaRG (Gripon et al., 2002; Macovei et al., 2010). Les différents modèles cellulaires connus d'être exploiter pour étudier le VHB et le VHD seront détaillés plus loin.

• Décapsidation et transport vers le noyau :

Suite à l'entrée dans les hépatocytes, la membrane des virions fusionne à celle des endosomes et la nucléocapside (contenant le génome viral) est acheminée aux pores nucléaires. L'ADN-rc est relargué dans le noyau et réparé en ADNccc. Il a été démontré que le domaine C-terminal, riche en arginine, de la protéine de la capside facilite le transport de la nucléocapside du cytoplasme aux pores nucléaires (Rabe *et al.*, 2003). Concernant le transport de la nucléocapside et le relargage du génome viral dans le noyau, deux modèles ont été proposés. Le premier modèle propose que le génome est libéré dans le cytoplasme avant d'être transporté par la polymérase virale vers le noyau (Gallucci & Kann, 2017; Kann *et al.*, 1997). Le deuxième modèle suggère que la nucléocapside est transportée vers les pores nucléaires où le génome sera libéré dans le noyau (Gallucci & Kann, 2017; Rabe *et al.*, 2003). Les deux modèles requièrent les protéines nucléaires importines alpha et bêta ainsi que la nucléoporine Nup 153 (Schmitz *et al.*, 2010).

• Formation de l'ADNccc à partir de l'ADN-rc

La conversion de l'ADN-rc en ADNccc s'effectue en plusieurs étapes qui se résument en (i) Achèvement de la synthèse du brin positif. (ii) Élimination de l'ARN en 5' du brin positif. (iii) Élimination de la polymérase liée au brin (-) de façon covalente. (iv) Élimination de l'extrémité redondante 5' du brin négatif. (v) ligature des extrémités 5' et 3' des brins positif et négatif (Morikawa *et al.*, 2016). Cette conversion implique plusieurs enzymes et facteurs de la cellule hôte (Mohd-Ismail *et al.*, 2019). Par exemple, il a été montré que l'ADN polymérase alpha cellulaire (Tang *et al.*, 2019) et l'ADN topoisomérase (Sheraz *et al.*, 2019) sont impliquées dans la synthèse de l'ADNccc.

L'ADNccc est la matrice de tous les transcrits viraux du VHB. La transcription est assurée par l'ARN polymérase II cellulaire (Rall *et al.*, 1983) et tous les ARN contiennent une coiffe en 5' et une queue polyA en 3' (signal de polyadénylation) (Seeger *et al.*, 1986; Simonsen & Levinson, 1983). De plus, des observations au microscope électronique révèlent la présence dans le noyau de la cellule infectée de l'ADNccc incorporé dans la chromatine de l'hôte et se comporte comme un « minichromosome » (Bock *et al.*, 1994; Bock *et al.*, 2001; Newbold *et al.*, 1995). Par conséquent, l'ADNccc est un facteur clé de persistance du VHB dans la cellule infectée et son élimination est une cible clé pour éliminer l'infection par le VHB (Nassal, 2015; Zhang *et al.*, 2013).

Réplication du génome et assemblage de la capside :

Les ARN viraux sont transportés vers le cytoplasme où ils sont traduits en différentes protéines virales. Parmi ces ARN, on trouve l'ARNpg qui sert pour la synthèse de la protéine core et de la polymérase virale, mais il sert également de matrice nucléotidique utilisée pour synthétiser une nouvelle copie d'ADN viral par transcription inverse à l'aide de la polymérase virale (Chou et al., 2005; Fallows & Goff, 1995). L'ARNpg présente la séquence virale entière ainsi qu'une séquence redondante de 120 nucléotides (Will et al., 1987). Cette dernière inclut le signal d'encapsidation (ϵ) en épingle à cheveux et la région DR1 pour « direct repeat » en position 1 (Kramvis & Kew, 1998; Summers & Mason, 1982). La réplication du génome viral commence par une étape cruciale qui consiste en l'encapsidation de l'ARNpg et la polymérase virale dans les capsides néosynthétisées (Ganem et al., 1994). D'une part, la polymérase virale interagit, de façon non covalente, avec l'AgHBc ce que permet une association indirecte entre l'ARNpg et la capside (Bartenschlager & Schaller, 1993; Ganem et al., 1994; Nassal et al., 1990). D'autre part, la polymérase virale se fixe sur la séquence (ε) pour déclencher l'encapsidation de l'ARNpg ainsi que la transcription inverse (Fallows & Goff, 1995; Ganem et al., 1994). Comme mentionné précédemment, la synthèse du brin d'ADN (-) commence par la fixation de la polymérase virale sur la séquence (ε) (Nassal & Rieger, 1996; Zoulim & Seeger, 1994). La polymérase virale a un

15

domaine de transcriptase inverse et un domaine ARNase-H (Cheng *et al.*, 2003a; Clark & Hu, 2015) ainsi elle assure l'élongation d'un brin d'ADN de polarité négatif et dégrade simultanément la matrice d'ARN par son activité d'ARNase-H (Karayiannis, 2017; Loeb *et al.*, 1991). L'extrémité du brin d'ADN (-) n'est pas dégradée par cette activité, ce que laisse un fragment de l'ARNpg de 20 nucléotides intact (Loeb *et al.*, 1991) (Haines & Loeb, 2007). Le fragment non dégradé est constitué du DR1 plus 6 nucléotides et il sert d'une amorce à la synthèse du brin d'ADN (+) (Lewellyn & Loeb, 2007). Les régions DR1 et DR2 sont identiques, ce qui leur permet de s'apparier. Le déplacement et l'hybridation du DR1 sur DR2 sont facilités par la présence des petites extrémités redondantes (r) (8 nucléotides) aux l'extrémité 5' et 3' du brin (-) (Nassal, 2015). L'appariement du brin (+) à l'extrémité (r) en 3' du brin (-) permet la circularisation du génome et le suivie de la synthèse du brin positif (Will *et al.*, 1987). La réplication du génome aboutit à un ADN partiellement bicaténaire (ADN-rc) caractérisé par la présence de la polymérase virale à l'extrémité 5' du brin (-) et une coiffe d'ARN à l'extrémité 5' du brin (+) (Bruss, 2004; Karayiannis, 2017).

Les nucléocapsides néoformées ont deux destinations. Une partie sera réadressée vers le noyau dans le but d'amplifier la formation de l'ADNccc pour ainsi établir une infection persistante. Une partie majoritaire sera enveloppée par les protéines d'enveloppe et sécrétée sous forme de particules de Dane (Dane *et al.*, 1970; Morikawa *et al.*, 2016).

Maturation, assemblage et sécrétion

Les étapes de maturation, assemblage et sécrétion impliquent les protéines d'enveloppe du VHB et la machinerie de sécrétion cellulaire. Les protéines d'enveloppe (S-AgHBs, M-AgHBs et L-AgHBs) s'accumulent dans le système sécrétoire de la cellule et elles sont synthétisées dans la membrane du RE (Eble *et al.*, 1986; Eble *et al.*, 1990). Comme décrit précédemment, les protéines d'enveloppe sont retrouvées non seulement à la surface des virions infectieux du VHB, mais aussi, elles bourgeonnent sous forme des particules sous virales (PSV). L'assemblage de ces dernières est initié par l'intégration des protéines S-AgHBs dans la membrane du RE, où elles s'associent en dimères. Ce processus implique la protéine chaperonne (résidente du RE) "isomérase de ponts disulfure" (PDI) pour « *protein disulphide isomerase* » (Huovila *et al.*, 1992). Dans le compartiment ERGIC, ces dimères s'associent en multimères et y bourgeonnent (Huovila *et al.*, 1992; Patient *et al.*, 2009; Patient *et al.*, 2007). Les PSV sont sécrétées ensuite soit à travers l'appareil de Golgi, pour les particules sphériques (Patzer *et al.*, 1986), soit à travers le corps multivésiculaire (MVB), pour les particules filamenteuses (Figure 1.4) (Jiang *et al.*, 2015). La concentration en L-HBsAg, différente entre ces 2 types de PSV, pourrait être à l'origine de ces différences d'adressage (Morikawa *et al.*, 2016).

Rappelons que la L-HBsAg est caractérisée par une topologie Pré-S alternative (Bruss *et al.*, 1994; Guo & Pugh, 1997; Ostapchuk *et al.*, 1994; Prange & Streeck, 1995). Ainsi, le domaine Pré-S dans sa disposition cytoplasmique qui contient un domaine matrice assure la maturation des virions du VHB (Bruss *et al.*, 1994). Ce domaine recrute ainsi la nucléocapside du VHB et permet son bourgeonnement à travers les MVB (Figure 1.4) (Watanabe *et al.*, 2007).

L-AgHBs interagit également avec le gamma 2 adaptine (Lambert *et al.*, 2007). Cette dernière appartient à la famille des protéines adaptatrices à la clathrine qui sont impliquées dans le trafic entre le réseau du Golgi et les endosomes et probablement dans la maturation du VHB dans les MVB. Il a été montré que le bourgeonnement du VHB dépend de la machinerie ESCRT (Lambert *et al.*, 2007; Zeyen & Prange, 2018).

La voie de la sécrétion des virions du VHB n'est pas encore caractérisée, cependant, il a été montré que le VHB est secrété suite de l'activation de la voie endo-lysosomale et la voie autophagique à travers l'activation de Rab7 (Inoue *et al.*, 2015). Dans cette étude, les auteurs ont démontré que dans le contexte des cellules HepG2.2.15 (expression stable du VHB), la protéine AgHBe active la protéine Rab7, cela engendre la formation d'un réseau tubulaire interconnecté des autophagosomes, des MVB et des lysosomes. Ce réseau favorise le transfert du virus entre ces différents comportements ce qu'entraînent la dégradation des virus néosynthétisés et la réduction de la sécrétion des virions. Cependant, dans le même modèle cellulaire, l'inhibition de l'expression de la Rab7 réduit l'interaction entre ces comportements, ainsi la quantité de virus intracellulaire et celle libérée augmentent parce que l'acheminement des virus vers les lysosomes pour la dégradation est réduit.

2 LE VIRUS DE L'HÉPATITE DELTA

2.1 Historique

En 1977, à l'université de Turin, l'antigène delta (AgHD) a été décrit comme étant une nouvelle entité immunologique présente seulement chez les patients infectés chroniquement avec le VHB (Rizzetto et al., 1977). Au début, l'antigène delta a été défini comme un variant du VHB ainsi qu'un indicateur des formes sévères du VHB (Rizzetto *et al.*, 1980a).

En 1986, le génome du virus de l'hépatite delta (VHD) a été cloné et séguencé (Wang et al., 1986). Le séquençage reflète une hétérogénéité à différentes positions du génome qui contient 1679 nucléotides. Étrangement, deux clones ont été identifiés, un contenant un codon stop UAG (Amber) au nucléotide 196 codant pour une protéine de 195 acides aminés et un autre clone contenant un codon UGG à la même position (196) qui a codé pour une protéine de 214 acides aminés (Wang et al., 1986; Xia et al., 1990). La présence de deux protéines rend l'estimation de la longueur de l'antigène delta complexe. Plus tard, l'étude de Weiner (Weiner et al., 1988) a montré que les clones contenant UAG ou UGG expriment la petite protéine (S-AgHD) ou la grande protéine (L-AgHD) respectivement. Ensuite, des études in vitro (culture cellulaire) et in vivo (co-infection chez des chimpanzés déjà infectés avec le VHB) ont démontré que cette hétérogénéité dans cette position se produit au cours de la réplication du VHD (Luo et al., 1990; Sureau et al., 1989). Par la suite, les études de (Casey et al., 1992; Luo et al., 1990) ont déduit que l'apparition d'hétérogénéité coïncide avec l'apparition de L-AgHD. Cela fut expliqué par un phénomène d'édition du génome au niveau du codon stop de S-AgHD. Cette édition est spécifiquement due à un mécanisme de conversion d'U- à -C (uridine à cytidine) au niveau de l'ARN génomique réalisé par la cellule hôte. Au cours de la réplication, le phénomène d'édition permet la suppression du codon non-sens marquant la fin de traduction de S-AgHD et le remplacement par un codon tryptophane qui déclenche la synthèse de la L-AgHD. Le site d'édition est nommé amber/W et permet la synthèse de la protéine L-AgHD qui diffère de la S-AgHD par son extension C-terminal de 19 acides aminés.

2.2 Épidémiologie

D'après des données récentes de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), 5% des personnes porteuses de l'antigène de surface AgHBs sont co-infectées par le VHD dans le

monde, soit 15-20 millions de patients. Les zones de forte prévalence sont les suivantes : Méditerranée, Moyen-Orient, Pakistan, Asie centrale et du Nord, Japon, Taïwan, Groenland, certaines régions d'Afrique (principalement la Corne de l'Afrique et l'Afrique de l'Ouest), bassin amazonien et certaines zones du Pacifique. La prévalence est en revanche faible en Amérique du Nord, en Europe du Nord, en Afrique du Sud et en Asie orientale (World Health Organisation, 2019a). Ils existent 8 génotypes du VHD classifiés de VHD-1 jusqu'au VHD-8 (Figure 1.5B) (Botelho-Souza *et al.*, 2017).

La distribution géographique du VHD est bien différente de celle du VHB malgré le fait que le VHD est dépendant du VHB. L'une des explications est le mode de transmission différent entre VHB et VHD. En effet, le VHD, comme le VHB, est transmis principalement par voie parentérale (à travers le sang et dérivés). Cependant, la transmission verticale est rare et la transmission sexuelle n'est pas fréquente (Masood & John, 2020; Mentha *et al.*, 2019).



Figure 1.5: Répartition géographique mondiale des VHB et VHD selon leurs génotypes

A : Répartition géographique du VHB : La couleur rouge représente les pays à prévalence élevée, la couleur orange représente les pays à prévalence modérée, la couleur jaune représente les pays à prévalence faible. Les lettres représentent les génotypes et sous-génotypes les plus prévalents dans chaque pays (Al-Sadeq *et al.*, 2019).

B : Répartition géographique du VHD : La légende en fonction de couleur est indiquée sur la partie gauche du schéma. La distribution génotypique est également désignée sur le schéma (Gilman *et al.*, 2019).

2.3 Classification

Selon le Comité international de taxonomie des virus, le VHD est une nouvelle espèce virale, n'appartenant à aucune famille, et seule membre du genre Deltavirus (Botelho-Souza *et al.*, 2017). Son mode de réplication ainsi que sa structure ressemblent aux phytopathogènes (viroïde et virusoids) (Brazas & Ganem, 1996). Le VHD est reconnu comme étant un virus satellite

du VHB. En effet le VHD ne peut infecter les cellules qu'en présence du VHB (Rizzetto *et al.*, 1980b).

2.4 Pathogenèse du VHD

Le VHD infecte les hépatocytes en association avec le VHB de façon aiguë ou chronique. Dans le cas d'une co-infection, les VHB et VHD infectent simultanément la cellule. Dans le cas d'une surinfection, le VHD infecte un patient préalablement infecté chroniquement par le VHB (Flores *et al.*, 2016; Negro, 2014). La surinfection peut mener à une infection aiguë fulminante ou à une infection chronique. Les dommages au foie causés par l'infection par le VHD augmentent considérablement par rapport à la mono-infection par le VHB (Flores *et al.*, 2016; Negro, 2014). Il a été suggéré que le VHD a un effet cytopathique direct, ou indirect probablement relié à une réponse immunitaire cellulaire T (Negro, 2014). Il a été proposé que la protéine S-AgHD du VHD soit impliquée directement dans la pathogenèse du VHD (effet cytopathique) (Cole *et al.*, 1991). La réplication du VHB est réprimée par le VHD. En effet, dans le cas d'une co-infection les dommages au foie sont dus principalement au VHD plutôt qu'au VHB (Negro, 2014). Un chapitre sur les conséquences des infections par le VHB et le VHD est présenté à la section (3).

2.5 Morphologie des virions et le génome du VHD

Le virion du VHD (Figure 1.6) est composé d'une enveloppe sphérique lipoprotéique semblable à celle du VHB (contenant l'AgHBs). Cette enveloppe entoure une ribonucléoprotéine (RNP) formée par association entre le génome viral et l'AgHD (Ryu *et al.*, 1993).

Le génome viral est un simple brin d'ARN circulaire à polarité négative d'une taille de 1,7 kb. Le génome s'auto apparie sur plus de 70% de sa séquence, donnant lieu à une structure secondaire pseudo-bicaténaire dite « en bâtonnet ». Le génome s'associe avec l'antigène delta donnant la RNP (Ryu *et al.*, 1993). Le génome du VHD se réplique selon le mécanisme du cercle roulant (Harichandran *et al.*, 2019; Lai, 1995).

Le génome du VHD contient deux ORF, le premier est situé sur le brin d'ARN antigénomique codant pour la protéine delta (les deux isoformes delta). Le deuxième, code pour un polypeptide, peptide K, dont la fonction est encore inconnue, mais dont l'expression dans certaines cellules infectées a déjà été démontrée (Bichko *et al.*, 1996). Le génome du VHD comporte une région codante pour la protéine delta et une région dite « viriod-like ». La première région contient un seul ORF permettant la production de l'AgHD. La deuxième région contient une séquence d'un ribozyme nécessaire pour la monomérisation du génome delta à partir des

21
concatémères issus de la réplication d'ARN. Dans une cellule infectée par le VHD, il existe trois formes d'ARN : i) l'ARN génomique, ii) l'ARN anti-génomique et iii) l'ARN messager (ARNm). L'ARN génomique est assemblé dans les particules virales. L'ARN anti-génomique, par définition, est complémentaire à l'ARN génomique (Taylor, 2006). L'ARNm possède une coiffe à son extrémité 5', une queue polyA (polyadénylée) à son extrémité 3' et contient la séquence codante pour l'AgHD.



Figure 1.6: Structure du VHD

La surface du VHD est formée d'une enveloppe lipidique dans laquelle sont ancrées les trois protéines d'enveloppe du VHB (L-AgHBs, M-AgHBs et S-AgHBs). L'intérieur du virion est constitué d'une ribonucléoprotéine qui est une association de l'ARN du VHD avec l'antigène delta sous ses deux isoformes (L-AgHD et S-AgHD) (Mentha *et al.*, 2019).

2.6 L'antigène delta

Durant la réplication du VHD, deux isoformes de la protéine delta sont produites, la S-AgHD et la L-AgHD. La protéine L-AgHD est produite à la suite d'une édition du codon stop amber (UAG) du S-AgHD en un codon tryptophane (UGG) par la protéine ADAR. L'édition est réalisée sur le brin d'ARN antigénomique (Casey, 2012; Weiner *et al.*, 1988) (Figure 1.7). Les deux isoformes de la protéine delta sont identiques dans leur portion N-terminale et diffèrent par leur partie C-terminale. En effet, L-AgHD, selon le génotype, contient 19 ou 20 acides aminés additionnels à l'extrémité C-terminale (Casey, 2012) (Figure 1.7 et 1.8).

Bien que globalement très similaires en séquence, les deux isoformes possèdent chacune un rôle différent dans le cycle de réplication du VHD. La S-AgHD permet la réplication du génome du VHD, alors que L-AgHD est impliqué dans l'assemblage des virions (Chang *et al.*, 1991; Chao *et al.*, 1990)

Les deux isoformes du VHD forment avec l'ARN viral une ribonucléoprotéine d'environ 20 nm de diamètre (Ryu *et al.*, 1993) (Figure 1.6). Les deux isoformes possèdent différents domaines indiqués dans la figure ci-dessous (Figure 1.8).



Figure 1.7: Mécanisme d'édition d'ARN du VHD

L'ARN génomique (indiqué en noir) sert de matrice pour la synthèse d'ARNm qui est traduit en S-AgHD. L'ARN génomique sert également de matrice pour la synthèse de l'ARN antigénomique (indiqué en noir) qui lui-même à son tour sert de modèle pour la synthèse des nouveaux ARN génomiques. Une fraction des ARN antigénomiques est éditée par l'enzyme adénosine désaminase (ADAR-1) au site appelé site Amber/W (codon stop UAG) ainsi l'adénine est remplacée par l'inosine. Les ARN antigénomiques édités (indiqué en orange) constituent une matrice pour la synthèse des génomes édités (indiqué en orange). Ces derniers servent pour la synthèse des ARNm édités, qui a un codon UGG- tryptophane (Trp, W) au lieu du codon stop UAG. Cet ARNm code pour la L-AgHD. Les génomes et les antigénomes sont synthétisés simultanément par un mécanisme de réplication en cercle roulant (Botelho-Souza *et al.*, 2017).

Des études par immunomarquage ont montré que la localisation nucléaire de la protéine delta dépend considérablement de la présence ou l'absence d'accumulation de l'ARN viral (Bichko & Taylor, 1996; Han *et al.*, 2009).

La S-AgHD est cruciale pour la transcription et la réplication de l'ARNm du VHD (Chao *et al.*, 1990; Glenn *et al.*, 1990; Glenn & White, 1991; Harichandran *et al.*, 2019; Kuo *et al.*, 1989; Yamaguchi *et al.*, 2001). Différentes études ont mis en évidence que la S-AgHD mime la stratégie des histones et recrute différents facteurs cellulaires pour supporter la synthèse des ARN viraux (Abeywickrama-Samarakoon *et al.*, 2018; Abeywickrama-Samarakoon *et al.*, 2020; Lucifora & Delphin, 2020). Il a été publié que la S-AgHD se polymérise en octamère et se lie à l'ARN viral (Alves *et al.*, 2010; Cornillez-Ty & Lazinski, 2003; Zuccola *et al.*, 1998). De plus, la S-AgHD

interagit avec l'histone H1e pour favoriser la réplication du VHD (Lee & Sheu, 2008). Il a été proposé que la S-AgHD interagit aussi avec d'autres facteurs cellulaires pour assurer la réplication de l'ARN viral. Parmi ces facteurs on cite la polymérase II (Cao *et al.*, 2009; Fu & Taylor, 1993; Rall *et al.*, 1983) et le facteur de transcription YY1 pour « *Yin-Yang 1* » (Huang *et al.*, 2008).

La L-AgHD a été décrite initialement comme inhibiteur de la réplication de l'ARN du VHD (Chao et al., 1990). Cependant, une étude ultérieure (Macnaughton & Lai, 2002b) suggère qu'une une fois la réplication de l'ARN est établie, la L-AgHD n'agit pas comme suppresseur de la réplication de l'ARN. Leurs résultats ont montré que la L-AgHD n'affecte pas le taux de synthèse d'ARN du VHD. De plus, une autre étude (Modahl & Lai, 2000) a montré que la L-AgHD inhibe la synthèse d'ARN génomique alors que la synthèse d'ARN antigénomique résiste à l'inhibition de la L-AgHD. La synthèse d'ARN antigénomique est inhibée seulement quand la L-AgHD est exprimée en excès par rapport à l'expression de la S-AgHD.

Par ailleurs, des études ont montré que la L-AgHD est responsable de l'assemblage des virions du VHD (Chang *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 2001). En effet, cette protéine, en présence ou non de la RNP, interagit avec l'AgHBs pour former les virions (Casey & Gerin, 1995; Chang *et al.*, 1991; Glenn *et al.*, 1992a; Hwang & Lai, 1993).

Il est intéressant de noter que la S-AgHD et la L-AgHD, par association avec l'ARN génomique lors de la formation de la RNP, protègent le génome contre une édition excessive par l'enzyme ADAR (Cheng *et al.*, 2003b). En effet, le taux et la quantité de l'édition sont bien équilibrés par l'interaction entre les deux isoformes de l'AgHD, et des régions bien spécifiques de l'ARN viral. Par ailleurs, une édition excessive inhibe la réplication d'ARN viral alors qu'une édition insuffisante réduit la sécrétion du virus (Cheng *et al.*, 2003b). Les AgHD agissent comme des chaperonnes pour l'ARN pour favoriser les activités des ribozymes du VHD (Huang & Wu, 1998).

Les deux isoformes de la protéine d'AgHD subissent différentes modifications posttraductionnelles importantes étant donné qu'elles peuvent changer les fonctions de la protéine. Ces changements jouent un rôle important tout au long du cycle de réplication du VHD. Le VHD utilise les enzymes cellulaires pour établir ces modifications (Abbas & Afzal, 2013; Rizzetto, 2016; Sureau & Negro, 2016). Ces modifications consistent en «la phosphorylation » (Hong & Chen, 2010), «la méthylation » (Li *et al.*, 2004), « l'acétylation » (Mu *et al.*, 2004) à la position Ser-177, Arg-13 et Lys-72 de la S-AgHD respectivement et « la sumoylation » aux plusieurs résidus lysines de la S-AgHD (Tseng *et al.*, 2010). Ces modifications post-traductionnelles sont importantes pour la synthèse de l'ARN génomique et ne les sont pas pour l'ARN antigénomique (Tseng *et al.*, 2010;

Tseng *et al.*, 2008). Cependant la L-AgHD subit «la prenylation» (farnésylation) à la position Cys-211 (Glenn *et al.*, 1992b). Cette modification de L-AgHD est importante pour l'assemblage des virions (Lee *et al.*, 1994). En effet, elle inhibe la réplication de l'ARN en faveur de l'enveloppement de la ribonucléoprotéine à la suite de sa combinaison avec l'AgHBs, (Hwang & Lai, 1993; O'Malley & Lazinski, 2005; Sato *et al.*, 2004).



Figure 1.8: Isoformes de l'antigène delta

L'antigène delta est synthétisé sous deux isoformes, la S-AgHD et la L-AgHD. La S-AgHD est synthétisée dans l'étape précoce de la réplication du génome du VHD. Un phénomène d'édition de l'ARN modifie le codon stop en codon tryptophane. Cette édition permet la synthèse de la deuxième isoforme la L-AgHD. Cette dernière est impliquée dans le processus de maturation des virions du VHD. Le schéma indique la localisation des différents domaines fonctionnels ainsi que le rôle de chaque domaine.

Monsieur Blanchet m'a donné l'autorisation avec amabilité pour utiliser cette figure dans ma thèse. (Blanchet, 2007).

2.7 Cycle de réplication du VHD

L'hépatotropisme du VHD est lié au processus d'entrée et à la co-infection avec le VHB. En effet, l'expression des glycoprotéines de surfaces du VHB dans la même cellule permet un cycle viral productif du VHD. Cependant, d'autres étapes des cycles de la réplication du VHB et VHD sont indépendantes. Ainsi le VHB ne semble pas contribuer à l'étape de la réplication du génome du VHD et vice-versa (Bichko & Taylor, 1996). Le cycle de la réplication du VHB nécessite des facteurs de transcription spécifiques au foie (Schaller & Fischer, 1991; Seeger & Mason, 2000; Shaul, 1992), alors que la réplication du génome du VHD peut être supportée par différents types cellulaires de mammifères en délivrant de manière expérimentale son génome dans la cellule (Chang *et al.*, 2005).

2.7.1 Entrée

L'entrée des particules virales dans la cellule hépatique nécessite des récepteurs cellulaires. Étant donné que le VHD partage la même enveloppe avec le VHB, il a le même mécanisme d'entrée que celui de VHB (décrit dans la section 1.8). En effet, l'infectivité de deux virus (VHD et VHB) dépend de la présence de L-AgHBs et du récepteur cellulaire NTCP (Figure 1.9) (Urban *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2012). Une fois dans le cytoplasme, la RNP est transportée vers le noyau (Figure 1.9) grâce au signal de localisation nucléaire de l'AgHD (Chou *et al.*, 1998; Tavanez *et al.*, 2002).

2.7.2 Réplication

Une fois dans les hépatocytes, le VHD ne nécessite pas la présence du VHB pour se répliquer (Cao *et al.*, 2009). La réplication de l'ARN du VHD se produit dans le noyau de la cellule infectée. La réplication du VHD dépend entièrement de la machinerie de réplication cellulaire (Cao *et al.*, 2009) (Figure 1.9). Il a été montré que l'ARNm du VHD possède une coiffe en 5' et une queue poly A en 3' comme l'ARNm cellulaire (Hsieh *et al.*, 1990). Différentes études ont suggéré que l'ARN polymérase II cellulaire est impliquée dans la réplication de l'ARN du VHD (MacNaughton *et al.*, 1991; Taylor, 2006). De plus, l'ARN polymérase II se lie à l'ARN du VHD de polarité génomique et antigénomique (Chang *et al.*, 2008; Greco-Stewart *et al.*, 2007).

Le rôle d'autres ARN polymérases dans la réplication du VHD constitue encore un débat. L'ARN polymérase I et l'ARN polymérase III se lient également à l'ARN du VHD. L'ARN polymérase I semble être impliquée dans la transcription d'ARN antigénomique (Greco-Stewart *et al.*, 2009). Le génome du VHD se réplique selon un modèle de cercle roulant (Branch *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1986). Ce modèle consiste en la génération des transcrits intermédiaires multimériques linaires, par la suite clivés en monomères par l'activité ribozyme en cis, puis religués (Kuo *et al.*, 1988; Lazinski & Taylor, 1995; Reid & Lazinski, 2000). L'ARN génomique sert de matrice à la synthèse d'ARN antigénomique, et réciproquement. Les ARNs génomique et antigénomique du VHD sont synthétisés lors de la réplication en quantité significativement différente (Macnaughton & Lai, 2006). La quantité de l'ARN antigénomique est 5 à 22 fois inférieure à celle de l'ARN génomique (Chen *et al.*, 1986; Gudima *et al.*, 2002). De plus, l'ARN antigénomique reste dans le noyau, plus précisément dans le nucléole, alors que l'ARN génomique se déplace entre le cytoplasme et le noyau et est incorporé dans les virions sécrétés (Macnaughton & Lai, 2002a) (Figure 1.9).

2.7.3 Assemblage et sécrétion

Comme mentionné précédemment, le VHD est capable, à l'aide de la machinerie cellulaire, de répliquer son ARN et de former la RNP indépendamment du VHB (Chen et al., 1986; Wang et al., 1986). En revanche, la formation et la sécrétion des virions du VHD nécessitent l'enveloppement de la RNP par les protéines d'enveloppe du VHB (Bonino et al., 1986). La L-AgHD est exprimée plus tardivement lors du cycle viral et elle est impliquée dans l'assemblage des virions. Comme présentée dans la Figure 1.8, le signal d'export nucléaire sur la L-AgHD permet le transport nucléo-cytoplasmique des RNP assemblées (Lee et al., 2001). Ce transport est aussi assuré à la suite de l'interaction de L-AgHD avec les protéines TAP/NXF1 pour « mRNA export transport receptor », Aly/REF pour « export adaptor mRNA-binding protein » au niveau du complexe d'export nucléaire et TREX pour « transcription-export complex » (Huang et al., 2016). Dans le cytoplasme, plus précisément dans les membranes du RE, les RNP sont farnésylées au niveau d'un motif CXXX à l'extrémité C-terminale de la L-AgHD (Hwang & Lai, 1993) (Figure 1.8 et 1.9). Les RNP farnésylées interagissent ainsi avec le domaine S de l'AgHBs du VHB présent aux membranes du RE (Hwang & Lai, 1993). Cette interaction permet le bourgeonnement des virions du VHD, probablement par la même voie de sécrétion des particules sous virales du VHB (Bonino et al., 1986; Sureau & Negro, 2016) (Figure 1.9). Il est important de mentionner que le déterminant d'enveloppement de la RNP du VHD est situé dans la boucle cytosolique II du domaine S de l'AgHBs du VHB (Komla-Soukha & Sureau, 2006) et qu'il est diffèrent de celui de la nucléocapside du VHB (preS de L-AgHBs) (Bruss, 1997). De plus, il a été suggéré que l'interaction de la L-HDAg avec la chaîne lourde de la clathrine favorise le trafic des RNP néosynthétisées par le réseau trans-Golgi (Huang et al., 2009; Huang et al., 2007; Wang et al., 2009). Récemment, il a été démontré que le VHD pouvait être secrété en présence des virus enveloppés (HCV, DENV) autre que le VHB (Perez-Vargas et al., 2019).

Malgré les connaissances actuelles des interactions entre le VHD et sa cellule hôte, les voies cellulaires impliquées dans la sécrétion et l'assemblage du VHD sont encore à explorer.



Figure 1.9: Cycle de réplication du VHD

Étape d'entrée du VHD, qui commence par l'attachement non spécifique avec les HSPGs, suivie par une interaction spécifique de L-AgHBs avec le récepteur cellulaire NTCP. (2) la RNP est transportée vers le noyau où le génome viral est libéré. (3) transcription du génome viral en ARNm. (4) traduction de l'antigène delta (AgHD). (5) réplication d'ARN viral, selon le mécanisme de cercle roulant, qui est assurée par de l'ARN polymérase ADN dépendante cellulaire et en présence de S-AgHD. Cette réplication génère des multimères et de l'ARN antigénomique intermédiaires. (6) Édition de l'ARN antigénomique par ADAR 1 qui entraîne l'expression de L-AgHD. (7) Farnésylation de L-AgHD qui favorise l'assemblage du VHD et régule sa réplication. (8) Assemblage de la ribonucléoprotéine dans le noyau et son export vers le cytoplasme. (9) enveloppement du RNP par les glycoprotéines du VHB à la suite de l'interaction entre L-AgHD et AgHBs du VHB. (10) Sécrétion du VHD à travers l'appareil de Golgi en parallèle avec les particules sous virales du VHB (Mentha *et al.*, 2019).

3 Conséquences des co-infection et surinfection par le VHB et le VHD

Comme mentionné précédemment, l'infection avec le VHD nécessite la présence du VHB lors d'une co-infection ou une surinfection. La mono-infection par le VHB est beaucoup moins sévère que la co-infection ou la surinfection. La présence de VHD aggrave la situation des patients et accélère la progression vers une infection chronique, la fibrose, la cirrhose ainsi que le cancer du foie (Freitas *et al.*, 2014; Freitas *et al.*, 2012).

Chez le patient adulte, la co-infection est généralement transitoire. Ainsi, la probabilité de développer une infection VHD chronique est la même que celle en cas de mono-infection par le VHB (5%). La réplication du VHB est généralement réprimée à la suite d'une infection par le VHD (Shirvani-Dastgerdi & Tacke, 2015). Cette suppression est persistante en cas d'infection chronique du VHD (Negro, 2014). Les patients co-infectés par les VHB/VHD présentent une virémie plus faible par rapport aux patients mono-infectés par le VHB (Jardi *et al.*, 2001). L'interférence entre le VHB et le VHD est expliquée également par l'étude de (Pollicino *et al.*, 2011), dans laquelle les auteurs montrent une perturbation de l'activité traductionnelle et transcriptionnelle du VHB chez des patients co-infectés par les deux virus. Ils ont montré que le niveau intrahépatique de l'ADN-rc et le niveau sérique d'ADN du VHB chez ces patients sont plus faibles en comparaison avec les patients mono-infectés par le VHB.

Dans un modèle de culture cellulaire, la quantification, par ELISA, de la synthèse et l'accumulation de l'AgHBs et l'AgHBe à partir des extraits cytoplasmiques et des surnageant des cellules Huh7 co-transfectées par le plasmide codant pour le VHB et le plasmide codant pour la L-AgHD et la S-AgHD, montre 4 à 5 fois moins d'AgHBs et d'AgHBe synthétisés et sécrétés (Williams *et al.*, 2009). L'inhibition exercée par le VHD sur la réplication VHB est soit directe ou indirecte. L'inhibition directe est exercée par la S-AgHD et la L-AgHD du VHD sur le « *Enhancer* 1 » et « *Enhancer* 2 » du VHB (Williams *et al.*, 2009). La S-AgHD réduit de 40 % l'activité de « *Enhancer* 1 » et de 10 % l'activité de « *Enhancer* 2 » alors que la L-AgHD exerce un effet d'inhibition indirecte est exercée par la L-AgHD uniquement (Williams *et al.*, 2009). Alors que l'inhibition indirecte est exercée par la L-AgHD uniquement (Williams *et al.*, 2009). Il a été montré que la protéine MxA pour « *Myxovirus resistance protein* 1 » est impliquée dans l'inhibition de la réplication du VHB (Gordien *et al.*, 2001; Peltekian *et al.*, 2005). Ainsi, l'étude de (Williams *et al.*, 2009) a exploré la possibilité que la L-AgHD agisse sur la voie impliquant la protéine MxA pour exercer son effet d'inhibition sur la réplication du VHB. Effectivement, cette étude, *in vitro*, a montré que l'expression de la L-AgHD seule ou en combinaison avec un

traitement par l'interféron alpha/bêta, induit le promoteur de gène *MxA* et augmente le niveau d'ARN de *MxA*. En effet, la L-AgHD transactive le gène *MxA* et par conséquent, une inhibition de la réplication du VHB est installée (Williams *et al.*, 2009).

Cependant, les auteurs d'une autre étude ont publié que chez des patients co-infectés par le VHD et le VHB, la réplication du VHB ainsi que l'activité du VHD fluctuent de façon dynamique au fil du temps de l'infection. De plus, le niveau de l'AgHBs dans le cas de mono-infection par VHB est stable alors qu'il fluctue dans le cas d'infection chronique par le VHD (Schaper *et al.*, 2010).

Des fragments de l'ADN viral du VHB, dont la taille varie de 28bp à 3215bp (Yang *et al.*, 2018), sont capables de s'intégrer dans le génome de la cellule infectée et se comportent comme des « minichromosomes » (Newbold *et al.*, 1995). Il est intéressant que différentes études ont mis en évidence que les hépatocytes peuvent produire les protéines d'enveloppe à partir de l'ADN du VHB intégré indépendamment de la réplication de l'ADN viral (Mak *et al.*, 2020; Mason *et al.*, 2010; Seeger & Mason, 2000; Wang *et al.*, 2002). Dans le cadre de l'interaction de deux virus VHB/VHD, l'étude de (Freitas *et al.*, 2014) a prouvé, *in vitro*, que les protéines d'enveloppe du VHB (L-AgHBs et S-AgHBs) produites à partir de l'ADN viral intégré sont suffisantes pour assembler et secréter les virions du VHD infectieux. Cette étude propose que le VHD peut persister dans la cellule indépendamment de la réplication d'ADN viral du VHB. Cela souligne l'importance de développer des traitements spécifiques au VHD. Ainsi, il est important de mentionner que les traitements actuels contre le VHB ne sont pas efficaces contre le VHD en cas de co-infection ou de surinfection (Mentha *et al.*, 2019).

4 Traitements

4.1 Traitements anti-VHB

L'objectif de la thérapie chez les patients infectés par le VHB est de supprimer la réplication virale et l'expression des protéines virales afin d'améliorer les fonctions hépatiques ainsi que la survie et la qualité de vie des patients infectés (Gkouvatsos *et al.*, 2017). Depuis des nombreuses années, l'interféron alpha standard était le traitement de choix pour l'infection par le VHB (Greenberg *et al.*, 1976; Lok *et al.*, 1984). Plus tard, l'interféron alpha standard était remplacé par l'interféron alpha pégylée afin d'améliorer sa stabilité et sa délivrance (Cooksley *et al.*, 2003; Woo *et al.*, 2017). Après 4 à 12 mois, l'efficacité de traitement par l'interféron est de 30% à 40% (Terrault *et al.*, 2018a). Cependant l'utilisation de cette molécule est associée d'effets secondaires

(syndrome pseudo grippal, une fatigue intense, dépression) diminuant sa tolérance et limitant son acceptabilité (Terrault *et al.*, 2018a).

Les analogues de nucléosides ou de nucléotide sont également des molécules validées pour le traitement de l'infection par le VHB (Nguyen *et al.*, 2020). Elles sont des antiviraux qui inhibent la réplication de génome du VHB et ciblent spécifiquement la polymérase virale (Le Guerhier *et al.*, 2000; Seignères *et al.*, 2002; Zoulim, 2004; Zoulim *et al.*, 1996). Ces antiviraux nécessitent un traitement de longue durée pour diminuer le risque de rechute (Terrault *et al.*, 2018a). Un des exemples de ces molécules est la Lamivudine qui peut être administrée, contrairement à l'interféron, en cas de cirrhose (Villeneuve *et al.*, 2000). La limitation majeure de cette molécule est le développement fréquent de résistance virale suite à l'émergence de mutations ponctuelles au niveau du site actif de la polymérase virale (Melegari *et al.*, 1998).

Compte tenu les effets secondaires accompagnés l'interféron et le risque de résistance associée à certains analogues nucléosidique ou nucléotides la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques est en plein expansion (Fanning *et al.*, 2019). En effet, différentes stratégies thérapeutiques ont été proposées.

La découverte de récepteur d'entrée virale, le NTCP, en 2012 (Yan *et al.*, 2012) a révolutionné la recherche des molécules antivirales ainsi une des stratégies antivirales cible le récepteur NTCP pour inhiber l'entrée du VHB (Fanning *et al.*, 2019). Comme exemple d'inhibiteur d'entrée on trouve Myrcludex B (Volz *et al.*, 2013) qui est synthétisé de 47 acides aminés dérivant de la séquence d'acide aminés de L-AgHBs. Myrcludex B se fixe, de façon compétitive, sur le récepteur NTCP et empêche la fixation de l'AgHBs par conséquent inhibe l'entrée du virus (Volz *et al.*, 2013).

Une autre stratégie cible l'étape de l'assemblage des capsides. Les composés qui inhibent la formation de la capside sont classés principalement en deux catégories, les modulateurs de la conformation de la protéine core (exemple RO7049389) et les modulateurs de l'assemblage de la capside (exemple JNJ637) (Yuen *et al.*, 2019; Zoulim *et al.*, 2018). Ces derniers permettent la formation des capsides morphologiquement intacts mais elles ne contiennent pas l'acide nucléique viral (Zoulim *et al.*, 2018). Les deux catégories permettent de réduire la sécrétion des particules infectieuses virales ainsi la diminution d'ADN et d'ARN viral extracellulaire. De plus, elles bloquent le transport des nucléocapsides au noyau ainsi la formation de l'ADNccc (Lahlali *et al.*, 2018).

Dernièrement, la stratégie qui cible la sécrétion de l'AgHBs en utilisant les NAPs (nucleic acid polymers). Ces derniers se sont des polymères d'acides nucléiques dont leur activité est basée sur leurs propriétés en tant que des polymères amphipathiques (Vaillant, 2016). Le mécanisme antiviral des NAPs n'est pas encore clair, mais leur activité post-entré lors d'infection par le VHB ont été montré. En effet, Les NAPs inhibent la sécrétion d'AgHBs des hépatocytes infectés par le VHB (Vaillant, 2016). Une étude récente d'essai clinique, a montré qu'une thérapie combinant REP 2139 et l'interféron alfa-2a pégylé permet d'établir un contrôle fonctionnel de l'infection VHB et la co-infection avec le VHD chez les patients durant un traitement d'une année (Bazinet *et al.*, 2020). De plus cette combinaison de thérapie semble être bien tolérée par les patients (Bazinet *et al.*, 2017).

4.2 Traitements anti-VHD

Comme expliqué précédemment le VHD exploite la machinerie cellulaire pour la réplication de son génome cependant son enveloppement et sa sécrétion sont dépendantes du VHB. Par conséquent, l'objectif de la thérapie du VHD est de supprimer sa réplication soit directement en agissant sur le VHD ou indirectement en ciblant le VHB. Actuellement, il n'existe aucun traitement approuvé par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) pour l'infection par le VHD mais l'Association américaine pour l'étude des maladies du foie (AASLD), l'Association pour l'étude du foie de l'Asie-Pacifique (APASL) et l'Association européenne pour l'étude du foie (EASL) recommandent l'interféron-α pégylé (peg-IFN-α) (European Association for the Study of the Liver, 2017; Sarin et al., 2016; Terrault et al., 2018b). L'utilisation de l'interféronα pégylé est limitée pour les patients non-cirrhotiques (Erhardt et al., 2006). Malgré l'absence de traitement approuvé pour l'infection par VHD ils existent des différentes investigations en cours pour développer des nouveaux médicaments pour éradiquer le VHD (Koh et al., 2019). Il a été montré que l'interféron-lambda-1a pégylé a un effet antiviral contre le VHD dans une étude in vivo sur un modèle de souris chimérique du foie humaine (Giersch et al., 2017). Récemment, une autre étude clinique, réalisée sur 33 patients chroniquement infectées par le VHD, a montré l'effet antiviral contre le VHD de l'interféron-lambda-1a pégylé avec une meilleure tolérance par rapport à l'interféron-α pégylé (Etzion *et al.*, 2019).

Comme le VHB et le VHD ont le même récepteur d'entrée dite NTCP (Yan *et al.*, 2012), l'une des stratégies thérapeutiques est l'inhibition de l'entrée en ciblant ce récepteur. Le Myrcludex-B a démontré un inhibiteur d'entrée pour le VHB et le VHD *in vitro* et *in vivo (Gripon et al., 2005; Lütgehetmann et al., 2012)*. Les essais cliniques avec Myrcludex-B associé ou non à

l'interféron-α pégylé ont démontré des résultats prometteurs après 24 semaines de traitement (Bogomolov *et al.*, 2016). Une autre stratégie thérapeutique repose sur l'inhibition d'assemblage du VHD (Bordier *et al.*, 2002) plus précisément l'inhibition de la farnésylation à l'extrémité C-terminale de la L-AgHD, une étape clé d'assemblage et la sécrétion des virions du VHD (Glenn *et al.*, 1992a; Lee *et al.*, 1994). Le Lonafarnib est un inhibiteur de farnesyltransferase qui perturbe l'interaction entre la L-AgHD et l'AgHBs (Bordier *et al.*, 2002) et qui a montré une réduction significative du niveau sérique de l'ARN du VHD (Koh *et al.*, 2015). Cependant, cette molécule a des effets secondaires tels que la nausée, la diarrhée et la perte de poids (Koh *et al.*, 2015).

La formation et la sécrétion des virions du VHD nécessitent la présence de l'AgHBs du VHB (Hwang & Lai, 1993). Par conséquent, l'une des stratégies thérapeutiques consiste à inhiber la sécrétion de l'AgHBs. Les NAPs ont été proposés comme des molécules thérapeutiques qui ont un effet antiviral également sur le VHD (Beilstein *et al.*, 2018). Dans une étude clinique, 12 patients infectés par le VHD ont été traités par REP2139-CA par perfusion intraveineuse une fois par semaine pour 15 semaines suivie par une thérapie combinée entre REP 2139-CA et l'interféron- α pégylé pour 15 semaines et ensuite une monothérapie avec l'interféron- α pégylé pour 33 semaines (Bazinet *et al.*, 2017). Les patients traités ont été suivie durant une année. Les résultats de cette étude prometteuse montrent une diminution significative du niveau de la virémie du VHD et une réduction de l'AgHBs et séroconversion à anti-HBs dans certains cas (Bazinet *et al.*, 2017). Il semble que les NAPs ont un effet antiviral à travers différents mécanismes d'action soit l'inhibition de la sécrétion de l'AgHBs (Noordeen *et al.*, 2015), soit la diminution de l'AgHBs intracellulaire à travers l'inhibition de l'assemblage de particules sous virales (Blanchet *et al.*, 2019b) soit l'interaction de NAPs avec S-AgHD et L-AgHD inhibant le cycle de réplication du VHD (Shamur *et al.*, 2017).

5 Les modèles cellulaires

5.1 Cultures primaires d'hépatocytes

5.1.1 Hépatocytes Humains

Les études sur le VHB et VHD utilisant les cellules primaires d'hépatocytes (PHH) sont limitées à différentes contraintes. Les PHH ont une durée de vie limitée à quelques semaines et elles sont difficiles à gérer dans des conditions de culture habituelles (Gripon *et al.*, 1988). Elles n'ont pas la capacité de s'amplifier (Levy *et al.*, 2015). De plus, il est difficile de s'approvisionner en hépatocytes humains (Gripon *et al.*, 1988). L'efficacité d'infection de PHH est faible et décline

rapidement après quelques jours de mise en culture (Galle *et al.*, 1994). La sensibilité à l'infection des PHH augmente par traitement avec la diméthylsulfoxyde (DMSO) et ajout de polyéthylène glycol (PEG) au moment de l'inoculation (Galle *et al.*, 1994; Gripon *et al.*, 1993; Gripon *et al.*, 1988; Schulze-Bergkamen *et al.*, 2003). La sensibilité à l'infection varie d'un prélèvement à l'autre (Galle *et al.*, 1994; Mabit *et al.*, 1996). En conséquent, une forte variabilité de donneur à un autre est observée ce que limite le nombre d'études reproductibles (Allweiss & Dandri, 2016).

5.1.2 Hépatocytes de Tupaïa

Les cultures primaires d'hépatocytes obtenues à partir de l'animal mammifère *Tupaïa belangeri,* dite PTH, sont sensibles à l'infection par le VHB et VHD (Walter *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 2012). L'utilisation du modèle cellulaire PTH a permis d'identifier le récepteur NTCP d'entrée du VHB et VHD (Yan *et al.*, 2012). Les PTH sont réfractaires à l'infection par WHV mais sont sensibles à l'infection par WMHBV (Köck *et al.*, 2001).

5.2 Lignées cellulaires hépatiques

Les lignées cellulaires HepG2 et Huh7 sont des lignées cellulaires dérivées hépatocarcinome largement utilisées comme modèle d'étude d'hépatocytes. Cependant, ces lignées cellulaires ne sont pas sensibles à l'infection par le VHB et VHD parce qu'elles ne permettent pas l'entrée du virus faute d'expression de récepteur d'entrée NTCP du VHB et VHD (Kullak-Ublick *et al.*, 1996; Meier *et al.*, 2013). L'un des avantages de ces lignées cellulaires est le fait de supporter la réplication du VHD. En effet, la co-transfection de ces cellules par le plasmide qui code pour le génome du VHD avec le plasmide codant pour les protéines d'enveloppe du VHB permet la production des virions du VHD infectieux (Blanchet & Sureau, 2007; Sureau *et al.*, 1994). De plus, la transfection de ces cellules par de l'ADN circulaire du VHB permet la production des viriales du VHB (Sureau *et al.*, 1986). Les cellules HepAD38 (Ladner *et al.*, 1997) et HepG2.2.15 (Sells *et al.*, 1987) sont des cellules dérivées des cellules HepG2, elles sont transduites de façon stable par le génome du VHB et permettent la production des particules infectieuses.

La lignée HepaRG est dérivée d'une tumeur hépatique d'une patiente souffrante d'un hépatocarcinome et d'une infection chronique par le virus de l'hépatite C qui a été décrite en 2002 (Gripon *et al.*, 2002). Le traitement à long terme des cellules HepaRG avec DMSO permet sa différentiation ainsi sa sensibilité à l'infection par le VHB et VHD (Gripon *et al.*, 2002).

La découverte de récepteur NTCP d'entrée du VHB et VHD était une étape clé pour développer de cellules hépatiques (HepG2-NTCP, Huh7-NTCP) sensibles à l'infection par le VHB et VHD par l'expression exogène de récepteur NTCP (Ni et al., 2014; Yan et al., 2012). Ce modèle cellulaire est considéré un outil utile pour étudier le cycle viral du VHB et VHD ainsi que l'interaction hôte-virus. Cependant, pour pouvoir infecter les cellules, il faut un titre viral très élevé (500 à 10000 équivalents de génome du VHB par cellule) (Allweiss & Dandri, 2016; Ni *et al.*, 2014).

6 L'AUTOPHAGIE

6.1 Découverte et définition

Le terme « autophagie » a été inventé par Christian de Duve en 1963. Cette dénomination a été décrite suite à des observations en microscopie électronique des vésicules à simples et doubles membranes. Ces vésicules contiennent une partie du cytoplasme incluant des organelles (Feng *et al.*, 2014; Klionsky, 2007; Tooze & Yoshimori, 2010). En 2016, le prix Nobel en physiologie et médecine a été accordé au professeur Yoshinori Ohsumi pour son implication dans la découverte et l'élucidation de mécanismes de l'autophagie (Tooze & Dikic, 2016). En grec, le terme autophagie signifie « se manger soit même ». L'autophagie a été considérée initialement comme étant une réponse à une privation nutritive. Plus tard, elle a été définie comme un processus cellulaire permettant à la cellule de dégrader et de recycler les organelles et les molécules défectueuses, mais aussi des pathogènes intracellulaires comme des bactéries ou des virus (Li *et al.*, 2020b).

Il existe trois types d'autophagie : i) l'autophagie médiée par les protéines chaperons, ii) la microautophagie et iii) la macroautophagie (Parzych & Klionsky, 2014). Les trois permettent la dégradation des composants cytosoliques dans les lysosomes. L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes n'est pas médiée par la vésicule à double membrane nommée autophagosome. Elle permet la dégradation sélective des protéines cytoplasmigues solubles dans les lysosomes (Arias & Cuervo, 2011). À la suite d'une interaction spécifique entre la protéine de choc thermique de 70 kDa (Hsc70) et une séquence d'acide aminé spécifique de la protéine à dégrader, l'ensemble est acheminé au lysosome (Arias & Cuervo, 2011; Mizushima et al., 2011). Lors de la microautophagie, la membrane du lysosome englobe directement une petite partie du cytoplasme. Le mécanisme et le rôle de cette dernière ne sont pas encore bien compris surtout dans les cellules des mammifères (Mizushima et al., 2011). La macroautophagie (référée par autophagie pour tout le reste de manuscrit) se déroule de façon canonique, ainsi elle correspond à la formation des autophagosomes selon le processus habituel illustré dans la Figure 1.10 (Codogno et al., 2011). Elle permet la dégradation des protéines cytosoliques par l'intermédiaire de l'autophagosome. La formation de cette dernière s'initie par la formation d'un phagophore qui englobe progressivement le cytoplasme, les protéines malformées, les protéines à longue durée de vie et les organelles. La vésicule ainsi formée fusionne alors avec les lysosomes pour dégrader le contenu (Figure 1.10). L'autophagie peut être sélective ou non

sélective (Yang & Klionsky, 2020). L'autophagie sélective est caractérisée par une spécificité élevée dans le choix et la livraison de la cargaison pour la dégradation, tandis que l'autophagie non sélective est caractérisée par la dégradation au hasard de contenu du cytoplasme et la manque de spécificité de sélection de la cargaison (Yang & Klionsky, 2020). De plus, il existe également l'autophagie non canonique durant laquelle la formation des autophagosomes n'est pas dépendante de toutes les protéines autophagiques. Ainsi, ce processus, à l'inverse de l'autophagie canonique, ne suit pas un ordre hiérarchique habituel, qui est décrit dans la Figure 1.10 (Codogno et al., 2011).



Nutrient or energy limitation or Infection



Le schéma représente un aperçu de la voie macroautophagique. Elle est activée à la suite d'un stress (carence nutritive ou énergétique et infection). La formation de l'autophagosome commence par la nucléation d'une vésicule, suivie par l'élongation de la membrane d'isolement et la fermeture de la vésicule. Ces étapes impliquent plusieurs protéines autophagiques (ATG) indiquées sur le schéma. L'autophagosome mature fusionne avec le lysosome pour former un autolysosome dans leguel le contenu séquestré est dégradé. Cette étape implique différentes protéines dont certaines sont indiquées sur le schéma, adapté de Liu & Levine, 2015.

6.2 Machinerie de l'autophagie

6.2.1 Initiation de l'autophagie

La formation de la double membrane des autophagosomes nécessite un apport important de lipides. Les organites donneurs des membranes peuvent être le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, la mitochondrie et les endosomes (Abreu *et al.*, 2013). De plus, la double membrane peut également être originaire de la membrane plasmique (Ravikumar *et al.*, 2010; Rubinsztein *et al.*, 2012). Il a été suggéré que ATG9, la seule protéine autophagique transmembranaire, fournit des lipides pour la formation des autophagosomes (Orsi *et al.*, 2010). Cependant dans une étude ultérieure, il a été montré que dans les cellules de mammifères, ATG9 ne s'intègre pas dans la membrane des autophagosomes, mais interagit de façon transitoire et dynamique avec les autophagosomes (Orsi *et al.*, 2012; Walker & Ktistakis, 2019). De plus, récemment, il a été découvert que la protéine ATG2 peut extraire les lipides des vésicules pour les transférer dans d'autres vésicules. Le transfert des lipides du réticulum endoplasmique vers les phagophores par ATG2 facilite l'expansion de l'autophagosome (Maeda *et al.*, 2019; Osawa *et al.*, 2019).

L'autophagie est activée à la suite d'un stress tel que la privation nutritive ou « starvation », essentiellement la déplétion en acides aminés et en facteurs de croissance. La protéine mTOR (Mammalian Target Of Rapamycin) est une enzyme de la famille des sérine/thréonine kinases (Saxton & Sabatini, 2017). Elle joue un rôle important dans la voie de signalisation activée en réponse aux nutriments et elle est composée de deux complexes (complexe 1 et 2) (Kroemer *et al.*, 2010; Saxton & Sabatini, 2017; Zoncu *et al.*, 2011). L'inhibition du complexe mTOR 1 par la Rapamycine active l'autophagie (Yip *et al.*, 2010).

À la suite de l'inhibition de mTORC1, une séquence d'évènements est déclenchée. Premièrement, l'activation du complexe ULK1 par autophosphorylation du domaine riche en proline et sérine (PS) spécifiquement entre les résidus 287 et 351 (Yan *et al.*, 1998). Ensuite, ULK1 active à son tour le complexe phosphatidylinositol-3-kinase classe 3 (PI3KCIII). Ce dernier permet la formation de phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) qui déclenche alors la formation du phagophore, appelé aussi membrane d'isolation, et le recrutement de plusieurs protéines autophagiques nommées « *autophagy related genes* » (ATG) (Figure 1.10) (Ganley *et al.*, 2009; Hosokawa *et al.*, 2009; McEwan, 2017; Mizushima, 2010; Shpilka *et al.*, 2012).

6.2.2 Élongation du phagophore

L'élongation du phagophore fait intervenir deux systèmes de conjugaison « *ubiquitin-like* ». Le premier est le système de conjugaison ATG12 (Shpilka *et al.*, 2012) qui aboutit à la formation du complexe ATG5-ATG12/ATG16L1 (Figure 1.10). La formation de ce complexe fait intervenir différentes protéines autophagiques qui se comportent comme des enzymes d'ubiquitination dites « *enzyme ubiquitine-like* ». La première protéine ATG à intervenir est ATG7, qui se comporte comme une enzyme ubiquitine-like E1. Cette dernière active ATG12 en se fixant sur son résidu glycine en C-terminal. Puis ATG12 est transférée à ATG10. Cette dernière est une protéine ubiquitine-like E2 qui permet la liaison covalente d'ATG12 à la lysine 130 d'ATG5. Ensuite le complexe ATG5-ATG12 forme un complexe multimérique avec ATG16L1 (Figure 1.10) (Glick *et al.*, 2010). Il a été rapporté que, *in vitro*, le complexe ATG5-ATG12/ATG16 s'attache aux membranes lipidiques d'une manière dépendante d'ATG16 et que cette association est nécessaire pour le processus autophagique. De plus, ATG16 est nécessaire pour la localisation du complexe ATG5-ATG12 au phagophore (Romanov *et al.*, 2012).

Le deuxième système de conjugaison « ubiquitine-like » est LC3 pour « Microtubuleassociated protein light chain 3 » (Figure 1.10) (Mizushima et al., 2011). La protéine LC3 est une protéine cytosolique qui est synthétisée en tant que précurseur. Après sa synthèse, les 22 résidus de l'extrémité C-terminal du précurseur LC3 sont immédiatement clivés par l'ATG4 (une protéase à cystéine) pour générer la LC3-I (Fujita et al., 2008). À la suite de l'induction de l'autophagie, la glycine carboxyterminale, exposée de LC3-I est conjuguée au phosphatidyléthanolamine (PE) par ATG7, ATG3 (activité de conjugaison E2-like) et le complexe ATG12-ATG5/ATG16L1 (activité de ligase E3-like) pour former la LC3-II (LC3-PE) (Figure 1.10. Le complexe ATG5-ATG12/ATG16L1 recrute ATG3, conjugué à LC3-I, à la membrane pour favoriser le transfert de LC3-I vers le PE situé à la membrane (Hanada et al., 2007). Ce complexe est également nécessaire pour la formation du phagophore (Walczak & Martens, 2013) De plus, il a été montré que la liaison de LC3 au PE nécessite l'association du complexe ATG5-ATG12 à l'ATG16L1 (Romanov et al., 2012).Le PE favorise l'intégration de LC3-II dans la membrane lipidique du phagophore et de l'autophagosome (Figure 1.10) (Glick et al., 2010). La LC3-II se trouve donc sur les membranes internes et externes des autophagosomes (Johansen & Lamark, 2020). La synthèse de LC3 et le processus de formation de LC3-II augmentent durant l'autophagie. Par conséquent, LC3-II est considérée comme un marqueur d'induction de l'autophagie dans la cellule (Klionsky et al., 2016).

••

6.2.3 Maturation des autophagosomes

Une fois l'autophagosome formé, il fusionne avec les lysosomes pour former un autolysosome dans lequel le contenu est dégradé. Cette étape de fusion est médiée par des protéines du complexe SNARE. Parmi ces protéines, on trouve la syntaxine 17 (STX17), la protéine 29 associée aux synaptosomes (SNAP29), et la protéine membranaire 8 associée aux vésicules (VAMP8) (Figure 1.10) (Wilkinson, 2020). Le complexe STX17-SNAP29 présent à la surface de l'autophagosome permet la fusion au lysosome qui exprime la VAMP8 sur sa membrane (Ahat *et al.*, 2019; Itakura *et al.*, 2012; Lorincz & Juhasz, 2019). De plus, l'étape de fusion fait intervenir aussi la protéine PLEKHM1, une protéine adaptatrice, qui favorise l'interaction entre LC3 et le complexe HOPS (Figure 1.10). Cette interaction favorise la fusion des autophagosomes aux lysosomes (Jiang *et al.*, 2014; McEwan *et al.*, 2015).

6.2.4 Dégradation sélective

Au début, l'autophagie était principalement connue comme étant un processus aléatoire de dégradation du matériel cytosolique. En effet, des expériences de microscopie électronique ont permis de visualiser différentes composantes du cytoplasme (mitochondries, des membranes du RE et du Golgi) dans la lumière des autophagosomes (Barth *et al.*, 2010; Eskelinen, 2008; Glick *et al.*, 2010). Cependant, l'autophagie n'est pas uniquement un mécanisme de dégradation aléatoire d'une partie de cytoplasme, mais est aussi un mécanisme de dégradation sélective. En effet, l'autophagie dégrade sélectivement les agrégats protéiques (agréphagie) (Sun *et al.*, 2020), les peroxysomes (pexophagie) (Germain & Kim, 2020), les mitochondries endommagées (mitophagie) (Ding & Yin, 2012) ainsi que les bactéries intracellulaires (Xénophagie) (Sharma *et al.*, 2018) et les virus (xénophagie et virophagie) (Mao *et al.*, 2019).

La sélection et l'identification du cargo à dégrader sont définies par des récepteurs autophagiques également appelées protéines adaptatrices telles que la protéine p62, la protéine NBR1 « *Neighbor of BRCA1 Gene 1* », la protéine NDP52 « *Nuclear Dot Protein 52* » et la protéine OPTN « *Optineurin* » (Shpilka *et al.*, 2012).

La protéine p62, également nommée sequestosome 1 (SQSTM1), est la première protéine adaptatrice autophagique sélective découverte chez les mammifères (Bjorkoy *et al.*, 2005; Pankiv *et al.*, 2007). C'est une protéine cellulaire multifonctionnelle contenant plusieurs domaines importants. Entre autres un domaine LIR « *LC3-interacting region* » (Pankiv *et al.*, 2007) et un domaine UBA « *C-terminal ubiquitin-associated domain* » (Ciani *et al.*, 2003). La protéine p62 interagit d'une manière non covalente avec les chaînes ubiquitines ou poly-ubiquitines des

protéines à travers le domaine UBA. Par la suite, les cargos ubiquitinylés sont transférés par la p62 à l'autophagosome à travers le domaine LIR (Lippai & Lőw, 2014). L'activation de l'autophagie permet la dégradation de la protéine p62. De ce fait, p62 est un excellent indicateur de l'état du flux autophagique (Klionsky *et al.*, 2016).

7 L'AUTOPHAGIE ET LES VIRUS

L'autophagie est un processus de catabolisme cellulaire dont le rôle principal est le maintien de l'homéostasie cellulaire (Ktistakis & Tooze, 2016). L'infection virale induit un stress cellulaire qui provoque l'activation de l'autophagie. Cette dernière permet la survie de la cellule face à ce stress, mais peut aussi, dans certains cas, aider les virus à subvenir à leur besoin en différents facteurs cellulaires et en énergie pour assurer leur cycle de réplication. Ainsi, bien que différentes études aient montré le rôle antiviral de l'autophagie, il a été observé que l'autophagie peut aussi avoir un rôle proviral (Choi *et al.*, 2018).

Le VHB interagit avec le processus autophagique, par exemple il peut induire l'autophagie à travers le stress du RE et la réponse aux protéines dépliées, UPR ou à travers ces protéines virales (Li *et al.*, 2011; Zhang, 2020) Par ailleurs, Le VHB manipule également l'étape de maturation des autophagosomes et profite de l'autophagie pour la réplication de son génome, pour l'assemblage et/ou l'enveloppement (Doring *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2011; Sir *et al.*, 2010). Les détails reliés seront expliqués dans la section (8.3).

7.1 Mécanismes d'induction de l'autophagie par les virus

7.1.1 Induction indirecte de l'autophagie par le stress du réticulum endoplasmique

Nombreux virus, par exemple le virus de la varicelle et du zona (Carpenter *et al.*, 2011) et le virus de la grippe (IAV) (Mehrbod *et al.*, 2019), sont connus pour activer l'autophagie en induisant le stress du réticulum endoplasmique et en déclenchant une réponse UPR. La signalisation de la voie UPR est médiée par trois médiateurs, l'ATF6 pour *« Activated Transcription Factor 6 »*, l'IRE1 pour *« Inositol Requiring Enzyme 1a »* et PERK pour *« Protein kinase RNA (PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase »*. Chacun des trois médiateurs ont un récepteur situé dans la lumière du RE et un domaine effecteur cytosolique (Shen *et al.*, 2002). L'accumulation de protéines virales au cours de la réplication des virus peut induire un stress du RE et déclenche une réponse UPR qui induit le processus autophagique (Ogata *et al.*, 2006). Cela a été prouvé, par exemple, pour les infections par le virus de l'hépatite C (VHC). En effet, l'infection par le VHC induit une réponse UPR définie par le clivage de la protéine ATF6, l'épissage de l'ARNm de XBP1 par l'activation de IRE1, ainsi que la phosphorylation de PERK (Ke & Chen, 2011; Sir *et al.*, 2008). De plus, l'activation de la voie UPR par la protéine core du VHC régule à la hausse les gènes autophagiques ATG12 et LC3 (Wang *et al.*, 2014).

7.1.2 Induction directe de l'autophagie par des protéines virales

L'autophagie peut être induite par l'expression des protéines virales. Par exemple, l'expression de la protéine non structurale NS5A du VHC est suffisante pour induire la conversion de LC3I en LC3II et former les autophagosomes (Shrivastava *et al.*, 2012). Cette protéine virale régule à la hausse l'expression de Bécline 1 pour induire l'autophagie (Shrivastava *et al.*, 2012). De plus, la protéine non structurale NS4B du VHC interagit avec les protéines Rab5 et Vps34, protéine clés pour l'initiation de l'autophagie (Li *et al.*, 2010; Ravikumar *et al.*, 2008) et permet ainsi la formation des vésicules autophagiques (Su *et al.*, 2011). La protéine NS4A du virus de la Dengue (DENV) induit l'autophagie à travers la voie PI3K pour « Phosphoinositide *3-kinase* » (McLean *et al.*, 2011). De plus, II a été montré que les protéines virales de *Poliovirus*, les PV2BC et 3A, sont responsables de la liaison de LC3I au PE et de la formation des autophagosomes. D'autres *Picornavirus*, par exemple, le HRV, le coxsackie virus B3 (CVB3) et le EV71, induisent également la synthèse de LC3II ainsi que la formation des autophagosomes (Choi *et al.*, 2018; Robinson *et al.*, 2018). La protéine Nef du VIH-1 est responsable de l'induction de l'autophagie (Kyei *et al.*, 2009).

7.2 Le rôle antiviral de l'autophagie

7.2.1 Virophagie

L'une des stratégies pour maintenir l'homéostasie cellulaire est la dégradation sélective des éléments « étrangers » à la cellule via l'autophagie par exemple. Ce processus est nommé xénophagie et permet le contrôle des infections par des micro-organismes intracellulaires, dont les virus (Levine, 2005). Il désigne la dégradation sélective de particules virales complètes (Mao *et al.*, 2019). Cependant, la dégradation par autophagie des composantes virales individuelles et nouvellement synthétisées est appelée virophagie (Choi *et al.*, 2018; Ma *et al.*, 2013). Dans cette section, nous citons des exemples de la dégradation autophagique par la virophagie (Figure 1.11).

Pour limiter la réplication du VHC, l'étude de (Kim *et al.*, 2016) a montré que la protéine résidente du RE SHISA5, également nommée « *IFN-β-inducible SCOTIN* » recrute la protéine virale NS5A du VHC aux autophagosomes et entraîne sa dégradation (Figure 1.11).

La capside de SINV colocalise avec la protéine p62, ce qui permet le mouvement de l'ensemble vers les autophagosomes pour une éventuelle dégradation par virophagie (Figure 1.11). La colocalisation est favorisée par les deux protéines, la E3 ubiquitine-protéine ligase

(SMURF1) et la protéine du groupe C de l'anémie de Fanconi (FANCC) (Figure 1.11) (Orvedahl *et al.*, 2010; Orvedahl *et al.*, 2011).

La virophagie a été aussi rapportée dans le contexte d'infection par le virus d'immunodéficience humaine 1 (VIH-1). Il a été montré que la protéine virale Vif interagit avec le complexe HDAC6 (l'histone désacétylase 6) / APOBEC3G pour favoriser sa dégradation autophagique (Valera *et al.*, 2015) (Figure 1.11). De plus, la protéine Tat du VIH est sélectivement dégradée par l'autophagie à la suite de son interaction avec la protéine autophagique p62 (Sagnier *et al.*, 2015) (Figure 1.11).



Figure 1.11: Le rôle antiviral de l'autophagie

Le schéma représente quelques exemples du rôle antiviral de l'autophagie. Les deux protéines SMURF1 et FANCC sont impliquées dans l'acheminement de la protéine de capside SINV à la dégradation par l'autophagie. La protéine Vif du VIH interagit avec le complexe HDAC6 / APOBEC3G ainsi elle favorise sa dégradation. L'autophagie dégrade sélectivement le transactivateur du VIH-1 Tat, une protéine essentielle à la transcription du VIH-1 et à la production de virions. La protéine NS5A du VHC interagit avec la protéine inductible SHISA5. Cette interaction favorise l'acheminement de NS5A aux autophagosomes pour une dégradation ultérieure. Adapté de Mao *et al.*, 2019.

7.2.2 Induction de réponses immunitaires innée et adaptative

L'autophagie est impliquée lors de la réponse immunitaire innée et adaptative (Choi et al., 2018). Commencant par l'immunité innée, première ligne de défense cellulaire, durant laquelle l'autophagie module différents éléments de voie de signalisation de la réponse interféron (Ma et al., 2013). Rappelons que, en réponse à une infection virale, l'interféron de type I (IFN-I) est produit (Ma et al., 2013). Cette production est déclenchée en réponse à la reconnaissance par des récepteurs appelés PRR pour « pattern recognition receptor » des motifs conservés spécifiques de micro-organismes appelés PAMPs pour « Pathogen Associated Molecular Patterns ». Parmi les classes de PRR on trouve les « toll-like receptors » (TLR), dont certains sont exprimés dans les endosomes (TLR 3/7/8/9) ainsi que les « RIG-like receptor » (RLR) qui sont des récepteurs cytosoliques (Delneste et al., 2007). Le TLR 3 détecte l'ARN double brin viral, le TLR 7 et le TLR 8 détectent l'ARN simple brin viral alors que le TLR 9 reconnaît l'ADN avec des sites CpG non méthylés. Le TLR 3 recrute les deux protéines adaptatrices MyD88 pour « Myeloid Differentiation factor 88 » et TRIF pour « TIR domain-containing adapter inducer IFN-β » alors que les autres TLR recrutent seulement la protéine adaptatrice MyD88. MyD88 et TRIF provoquent l'activation des cascades de signalisation aboutissant à la production des IFN-I. Par ailleurs, les RLR, le gène I inductible par l'acide rétinoïque (RIG-I) et la protéine associée à la différenciation mélanome 5 (MDA-5), interagissent avec la protéine MAVS pour induire une cascade de signalisation qui aboutit à la synthèse d'IFN-I (Figure 1.12-A) (Lee & Kim, 2007). Pour activer l'autophagie, la stimulation des TLR aboutit à l'association de MyD88/TRIF à Bécline 1, protéine impliquée dans l'initiation de l'autophagie. Cette liaison perturbe l'interaction entre Bcl 2 et Bécline 1 et induit l'autophagie. Cependant, la dégradation sélective par l'autophagie de TRIF inhibe la voie de signalisation des TLR (Figure 1.12-A) (Yang et al., 2017a). L'autophagie semble donc avoir un rôle important dans la production de l'interféron de type I à travers l'activation des TLR. Ainsi les protéines autophagiques et les autophagosomes semblent être impliqués dans l'acheminement des PAMPs (ou des acides nucléiques virales) aux endosomes exprimant les TLR. Cette association entre les PAMPs et les TLR induit la production des interférons (Figure 1.12-A) (Ma et al., 2013; Mao et al., 2019; Yordy et al., 2013). Il a été observé que la production d'IFN-I dépendante du TLR 7 est diminuée dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes déficientes en ATG5 et infectées par le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) ou par le virus Sendai (Heung Kyu Lee et al., 2007).

L'autophagie est également impliquée dans la réponse immunitaire adaptative en favorisant la présentation antigénique aux cellules immunitaires. Lors de différentes infections virales, le processus autophagique permet de générer des antigènes viraux et de les associer aux complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II, assurant une présentation antigénique aux cellules T (Choi *et al.*, 2018). Il a été montré que l'autophagie est impliquée dans la présentation de l'antigène nucléaire 1 de l'Epstein-Barr virus (EBNA1) en complexe avec le CMH classe II des lignées cellulaires B (Paludan *et al.*, 2005) (Figure 1.12-B). Dans le même contexte l'inhibition de l'autophagie (inhibiteur de PI3K ou « *knockdown* » d'ATG12) peut causer une accumulation d'EBNA1 dans les autophagosomes et une diminution de la capacité de sa reconnaissance en association au CMH-classe II par les cellules spécifiques T CD4+ (Choi *et al.*, 2018; Paludan *et al.*, 2005). Un autre exemple de l'implication de l'autophagie lors de la présentation antigénique est la présentation de la glycoprotéine B du virus herpès simplex-1 (HSV-1) à travers le CMH-classe I (Ahmad *et al.*, 2018; English *et al.*, 2009) (Figure 1.12-B). Il a également été montré que la présentation par le CMH-classe II de la protéine Gag du VIH-1 et du virus d'immunodéficience simienne (SIV) et de la protéine de matrice (MP1) du virus d'influenza A est améliorée par le processus autophagique (Figure 1.12-B) (Ahmad *et al.*, 2018; Choi *et al.*, 2018).



Figure 1.12: Autophagie et réponse immunitaire innée et adaptative

L'autophagie est impliquée dans la réponse immunitaire innée et adaptative. **(A) Immunité innée :** Les récepteurs Toll-like (TLR) localisés sur la membrane endosomale reconnaissent les acides nucléiques viraux, ainsi ils recrutent la protéine TRIF et la protéine MYD88. Cette dernière transmet les signaux vers le facteur NF-kB et MAPK. La liaison à TRIF et MYD88 provoque la dissociation du complexe de Bécline 1 avec BCL-2 donc l'activation de l'autophagie. La protéine TRIF est dégradée par l'autophagie à la suite de son acheminement vers l'autophagosome par le complexe TRIM32-TAX1BP1. JNK phosphoryle BCL-2 pour initier l'autophagie médiée par Bécline 1. Durant l'infection par des virus à ARN, les récepteurs RIG-I et MDA5 détectent l'ARN double brin viral. Des signaux sont transmis via la protéine de signalisation antivirale mitochondriale (MAVS) pour activer le facteur de régulation de l'interféron 3 (IRF3). Par conséquent, l'interféron est produit. Le complexe ATG5-ATG12 perturbe l'interaction entre RIG-I et MAVS, ainsi il inhibe la signalisation de RIG-I. **(B) Immunité adaptative :** le processus autophagique permet la livraison des antigènes intracellulaires et extracellulaires des autophagosomes aux endo-lysosomes. Ainsi, ces antigènes seront associés aux complexes majeurs d'histocompatibilité I ou II (MHC I, MHCII) pour être présentés aux cellules T-CD8+ ou aux cellules T-CD4+ respectivement. EBNA1: EB nuclear antigen 1, Gag: Group-specific antigen, gB: Glycoprotein B, MP1: Matrix Protein 1. Adapté de Choi *et al.*, 2018.

8 Neutralisation de l'autophagie et autophagie provirale

Les virus sont des parasites obligatoires intracellulaires qui ont développé des stratégies pour s'échapper de la dégradation autophagique. Certains virus ont développé des mécanismes pour détourner le processus autophagique à leur profit (Choi *et al.*, 2018)

8.1 Echappement de la dégradation par l'autophagie

8.1.1 Inhibition de l'initiation de l'autophagie

Pour échapper à l'action antivirale de l'autophagie, différents virus inhibent l'initiation de l'autophagie. Le HSV-1, par exemple, inhibe l'initiation de l'autophagie soit par la protéine ICP34.5 (Tallóczy *et al.*, 2006) exprimée précocement au cours de l'infection, soit par la protéine US11 (Lussignol *et al.*, 2013) exprimée tardivement durant le cycle de réplication. La protéine virale ICP34.5 bloque la signalisation induite par la PKR pour « *double-stranded RNA dependent Protein Kinase* » et interagit avec la protéine Bécline 1 (Tallóczy *et al.*, 2006). Cependant, la protéine virale US11 n'interagit pas avec la protéine Bécline 1, mais exerce son effet d'inhibition de l'autophagie en interagissant avec la PKR (Lussignol *et al.*, 2013). Nous mentionnons que Bécline 1 et la voie PKR sont des éléments clés d'initiation de l'autophagie (Jackson, 2015). Un autre exemple intéressant est l'infection par le cytomégalovirus humain (HCMV) qui permet très tôt l'induction de l'autophagie, mais après expression des protéines virales le virus bloque l'autophagie par l'expression de la protéine virale TRS1 qui interagit avec la protéine Bécline 1 (Chaumorcel *et al.*, 2012).

8.1.2 Inhibition de la maturation des autophagosomes

Certains virus manipulent l'autophagie en inhibant la maturation des autophagosomes. Des virus comme le virus coxsackie du groupe B3 (CVB3) et le virus parainfluenza type 3 humain (HPIV3), inhibent la fusion des autophagosomes avec les lysosomes en ciblant les protéines SNAR. Ce blocage de flux favorise la réplication et la production des virus (Ding *et al.*, 2014; Mohamud *et al.*, 2018). De plus, il a été rapporté que le VHC induit un processus autophagique incomplet dans les hépatocytes. En effet, la protéine virale NS4B induit l'expression de la protéine Rubicon pour « *Run domain Beclin-1 interacting and cysteine-rich containing protein »* qui inhibe la maturation des autophagosomes. À l'inverse, l'infection par le VHC inhibe l'expression d'UVRAG pour « *UV resistance-associated gene* » connu pour favoriser la maturation des autophagosomes dans la cellule infectée par le VHC (Wang *et al.*, 2015). De plus, le VHC induit la production des autophagosomes dans la cellule infectée par le VHC (Wang *et al.*, 2015). De plus, le VHC induit la production des autophagosomes dans la cellule infectée par le VHC (Wang *et al.*, 2015). De plus, le VHC induit la production des autophagosomes dans la cellule infectée par le VHC (Wang *et al.*, 2015). De plus, le VHC induit la production des autophagosomes dans les hépatocytes, mais il inhibe la dégradation vraisemblablement par une insuffisante fusion des autophagosomes aux lysosomes (Sir *et al.*, 2008). Il a également été observé que l'infection par le VHC provoque une altération de l'acidification des autophagique (Taguwa *et al.*, 2011).

8.2 Détournement de l'autophagie au profit des virus

Les virus peuvent non seulement s'échapper de l'effet antiviral de l'autophagie, mais aussi développer différentes stratégies pour détourner le processus autophagique afin de favoriser leur cycle de réplication (Mao *et al.*, 2019).

Des autophagosomes comme plateformes de réplication

Prenons comme exemple le VHC qui utilise l'autophagie pour favoriser sa réplication d'ARN (Ait-Goughoulte et al., 2008; Fahmy et al., 2018; Fahmy & Labonte, 2017; Guévin et al., 2010; Sir et al., 2008; Sir et al., 2012) (Figure 1.13). En effet, différentes études ont montré que l'inhibition de l'autophagie provoque une inhibition de la réplication du VHC indiquant que l'autophagie est importante pour la réplication d'ARN viral. Par exemple, l'étude de (Dreux et al., 2009) a suggéré que l'autophagie est importante pour l'initiation de la réplication du VHC. Une étude réalisée dans notre laboratoire a montré que l'inhibition de l'expression de l'ATG5 par siRNA bloque la réplication du VHC et que la protéine ATG5 interagit avec les protéines virales NS5B et NS4B, deux protéines nécessaires pour la réplication d'ARN viral (Guévin et al., 2010). De plus, il a été publié que les protéines virales NS5A et NS5B, qui sont deux protéines du complexe de réplication du VHC, et l'ARN viral colocalisent avec les autophagosomes. Cela suggère que le VHC exploite les membranes autophagosomales comme site de réplication de l'ARN viral (Ferraris et al., 2010; Sir et al., 2012). Deux autres études réalisées dans notre laboratoire (Fahmy et al., 2018; Fahmy & Labonte, 2017) ont démontré que le complexe d'élongation ATG5-ATG12 est nécessaire pour la réplication d'ARN viral. Ainsi, seulement la protéine ATG5, sans ATG16 ni LC3, interagit avec différentes protéines du VHC. De plus, la purification des réseaux membranaires du VHC, site de réplication virale, montre la présence de ATG5-ATG12 et ATG16 avec les protéines non structurales virales du VHC.

L'autophagie pour l'assemblage ou l'enveloppement des virus

L'autophagie est aussi impliquée dans l'assemblage et la maturation de certains virus à ARN et de virus à ADN. Ainsi, elle favorise l'assemblage du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). En effet, il a été montré que la protéine virale Gag se lie à la protéine autophagique LC3II et que la protéine p17 colocalise avec des éléments membranaires. Ces derniers expriment la protéine LC3 et représentent les sites d'assemblage du virus (Kyei *et al.*, 2009) (Figure 1.13).

La maturation des particules virales du DENV nécessite un processus autophagique intact. En effet, l'inhibition de l'autophagie aboutit à la formation des particules virales du DENV défectives (Mateo *et al.*, 2013).

L'autophagie peut également être provirale durant l'étape d'enveloppement des virus, comme c'est le cas pour le VHB (voir section 8.3) (Li *et al.*, 2011). De plus, il a été montré que la voie autophagique est essentielle pour l'enveloppement du virus de la grippe A (IAV) et pour la formation des particules virales morphologiquement intactes (Figure 1.13). Ceci dépend de l'interaction entre la protéine M2 du virus de la grippe avec la protéine LC3 (Beale *et al.*, 2014). Les herpesvirus sont des virus à ADN enveloppés pour lesquels l'autophagie joue un rôle important pour l'acquisition de leur enveloppe. En effet, l'EBV recrute les membranes autophagiques contenant la LC3 pour former son enveloppe (Figure 1.13) (Nowag *et al.*, 2014).

L'autophagie pour la sécrétion des virus

L'autophagie favorise la sécrétion et la propagation de certains virus entre les cellules. Par exemple, le virus VIH-1 profite de l'autophagie pour la sécrétion des particules virales. Ainsi, l'inhibition de l'autophagie dans des macrophages par « *knockdown* » des gènes ATG7 et *BECN1* (code pour Becline1) provoque la diminution de la production des particules virales du VIH-1 (Figure 1.13).

L'autophagie est aussi essentielle pour une propagation efficace entre des cellules voisines des virus de la famille de *Paramyxoviridae* y compris les Morbillivirus, et des autres virus comme Canine Distemper Virus (CDV), Measles Virus (MeV), Nipah Virus (NiV), Hendra Virus (HeV), et Mumps Virus (MuV) (Figure 1.13) (Delpeut et al., 2012).

Les virus non enveloppés de la famille de *Picornaviridae* (PV, HRV, CVB3) profitent de l'autophagie pour favoriser leur sécrétion non lytique puisque ces virus ont été retrouvés dans les autophagosomes. L'inhibition d'expression des gènes ATG12, LC3 et *BECN1* diminue la sécrétion des *Picornaviridae* (Figure 1.13) (Sun *et al.*, 2019).

Contrairement aux plusieurs études (Ait-Goughoulte *et al.*, 2008; Fahmy *et al.*, 2018; Fahmy & Labonte, 2017; Guévin *et al.*, 2010; Sir *et al.*, 2008; Sir *et al.*, 2012) qui ont démontré que l'autophagie favorise la réplication d'ARN du VHC, deux publications ont montré que l'autophagie est nécessaire aussi pour la production et la sécrétion des particules infectieuses du VHC (Figure 1.13). En effet, l'inhibition de l'expression de ATG7 et Bécline 1 par siRNA provoque une réduction des particules virales extracellulaires ainsi qu'une accumulation de l'ARN viral et les particules infectieuses à l'intracellulaire (Shrivastava et al., 2016; Tanida et al., 2009).

Il a été démontré que le titre viral du virus de la stomatite vésiculaire (VSV) dans le surnageant de la culture cellulaire diminue significativement dans les cellules qui n'expriment pas l'ATG5. Le complexe protéique autophagique ATG5-ATG12 interagit avec RIG-I. Cette interaction

perturbe la cascade de signalisation, par conséquent elle inhibe la production de l'interféron type l (Figure 1.12A) (Jounai *et al.*, 2007).





Différents rôles proviraux de l'autophagie lors de différentes étapes de cycle de réplication des virus sont présentés. Différents exemples des virus qui profitent de l'autophagie sont également présentés (panneau marron à gauche) adapté de Robinson *et al.*, 2018.

8.3 L'Autophagie et le VHB

Le VHB induit l'autophagie

Plusieurs études ont montré que le VHB induit l'autophagie *in vitro* et *in vivo*. D'une part, dans le contexte d'expression transitoire du VHB dans les cellules Huh7 et HepG2, des études ont montré la conversion de LC3I en LC3II, l'augmentation du pourcentage des cellules positives pour GFP-LC3II et l'augmentation du nombre des vacuoles à double membrane (Li *et al.*, 2011;

Mao *et al.*, 2011). De plus, dans le contexte d'expression stable du VHB par les cellules HepG2.2.15, l'activation de l'autophagie à travers la conversion de LC3I en LC3II a été mise en évidence (Wang *et al.*, 2013). D'autre part, il a été observé que l'autophagie est activée dans le foie de patients infectés par le VHB (Sir *et al.*, 2010; Yeganeh *et al.*, 2015). De plus, l'induction de l'autophagie a également été confirmée dans les cellules du foie dans un modèle de souris transgénique pour le VHB (Tian *et al.*, 2011). Les deux protéines virales responsables de l'activation de l'autophagie, selon du groupe de recherche, sont la protéine HBx et/ou la protéine S-AgHBs.

Induction de l'autophagie par la S-AgHBs du VHB

Les travaux de (Li *et al.*, 2011) ont montré que la protéine S-AgHBs induit l'autophagie à travers l'activation de la réponse cellulaire au stress du réticulum endoplasmique appelée la réponse de la protéine dépliée (UPR). Cette étude a été conduite *in vitro* par une expression transitoire soit du VHB complet soit de la protéine d'enveloppe S-AgHBs. Ils ont confirmé l'activation de l'autophagie par le VHB en évaluant l'expression de la protéine LC3II. Ils ont également évalué l'expression de la protéine p62 des cellules qui expriment le VHB et ont conclu que le VHB bloque le flux autophagique. De plus, en effectuant différentes mutations dans le plasmide pHBV1.3, et l'expression transitoire dans les cellules Huh7 de la protéine S-AgHBs, par le plasmide pcDNA3.1-Flag-SHB, l'équipe a montré que cette protéine virale est suffisante pour induire la conversion de LC3I en LC3II et l'accumulation des autophagosomes. Cette étude a démontré que la protéine S-AgHBs active l'autophagie à travers l'induction de stress du RE. En effet, suite à l'inhibition de la voie de signalisation UPR par des siRNA dirigés contre les trois protéines clés médiatrices de cette voie; l'ATF6, l'IRE1 et la PERK, la formation de LC3II par la protéine S-AgHBs est inhibée.

Induction de l'autophagie par la protéine HBx du VHB

La protéine HBx est considérée comme étant une protéine multifonctionnelle (Slagle *et al.*, 2015). En effet, elle est impliquée dans la régulation de différentes étapes du cycle de réplication du VHB ainsi que dans différentes voies cellulaires (Slagle & Bouchard, 2016). Différentes études ont mis en évidence le rôle de la HBx dans la modulation de l'autophagie par le VHB. Ces travaux ont prouvé l'implication de la protéine HBx au niveau précoce et tardif du processus autophagique. De plus, différentes voies de signalisation ont été suggérées pour montrer que la HBx régule les différentes étapes de l'autophagie (Figure 1.14) (Bagga *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2014; Sir *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2014; Zhong *et al.*, 2017).

Il a été montré que la protéine HBx module à la hausse l'expression génique et protéique de Bécline 1, *in vitro*, sous une condition nutritive restrictive, et induit la formation des vacuoles autophagiques (Tang *et al.*, 2009). La diminution d'expression de Bécline 1 par des siRNA dans des cellules exprimant la protéine HBx diminue le niveau de l'autophagie mesuré par le pourcentage des cellules positives avec des ponctuations de la GFP-LC3. Cela permet de conclure que cette protéine virale induit l'autophagie dans des conditions pauvres en nutriments et que cette induction dépend de Bécline 1 (Tang *et al.*, 2009).

L'étude de (Zhang *et al.*, 2014) a suggéré que l'autophagie est induite à la suite de l'activation de la protéine kinase 1 associée à la mort (DAPK) par la protéine HBx. Cette protéine virale favorise l'expression de Bécline 1. Cette publication propose que la voie de signalisation JNK n'est pas impliquée dans l'activation de l'autophagie (Figure 1.14).

Cependant un autre groupe de recherche (Zhong *et al.*, 2017), a montré que la protéine HBx favorise la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la cellule, ce qui engendre l'activation de la voie de signalisation JNK. La protéine HBx perturbe l'interaction entre Bcl 2 et Becline 1 ce qui induit l'autophagie (Figure 1.14).

De plus, il a été montré que l'expression transitoire de la protéine HBx dans les cellules HepG2, ainsi que l'expression consécutive du VHB dans les cellules HepG2.2.15, active l'autophagie. Le traitement des cellules exprimant la HBx par la Rapamycine (inhibiteur de mTOR) augmente le niveau de l'autophagie. Cependant, le traitement de ces cellules par l'inhibiteur de PI3K-Akt (LY294002) diminue considérablement le niveau de l'autophagie. Ainsi il a été proposé que la HBx active l'autophagie probablement à travers la voie PI3K-Akt-mTOR (Gao *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2013). En revanche les travaux de (Liu *et al.*, 2014) suggère que la protéine HBx induit la formation des autophagosomes indépendamment de l'inhibition de mTOR.

L'étude de (Mao *et al.*, 2011) a démontré qu'en condition de carence nutritive, les cellules HepG2 transfectées par la protéine HBx activent l'autophagie. Alors qu'en condition nutritive normale, elles n'activent pas l'autophagie. La même observation a été faite dans les cellules HepG2.2.15. La protéine HBx favorise la survie cellulaire en condition de carence nutritive en inhibant l'apoptose et en activant l'autophagie. Ces travaux démontrent que cette protéine virale inhibe la sécrétion de cytochrome c et AIF par les mitochondries ainsi que l'activité des caspases 3 et 9, ce qui explique l'activité anti-apoptotique de la protéine HBx à travers la voie mitochondriale (Mao *et al.*, 2011). De plus, il a été proposé que la protéine HBx favorise l'activité enzymatique de PI3KC3 et accroît ainsi l'activation de l'autophagie (Figure 1.14) (Sir *et al.*, 2010).

Une étude récente (Wang *et al.*, 2019) a montré, *in vitro* et *in vivo*, que la protéine HBx interagit avec c-myc. Cette interaction inhibe l'expression de miRNA-192-3p. Par conséquent, l'expression de la protéine inhibitrice de l'apoptose liée au chromosome X (XIAP) est augmentée. Cette augmentation active la protéine NF-κB ce qui active l'autophagie à travers la protéine Bécline 1 (Figure 1.14).

Le VHB et le flux autophagique

Il a été publié que la protéine HBx inhibe la dégradation autophagique. L'étude de (Liu *et al.*, 2014) a montré que cette protéine virale perturbe l'acidification des lysosomes. Cette perturbation est causée à la suite d'une interaction de la protéine HBx avec la V-ATPase (Figure 1.14). De plus, il a été constaté une diminution de la dégradation de la protéine LC3 et de la protéine p62 dans les cellules exprimant la protéine HBx. Dans la même étude, ils ont montré que l'expression de la protéine p62 est élevée dans des échantillons cliniques (tissues de patients chroniquement infectés par le VHB ayant un cancer de foie associé au VHB). D'autre part, les études de (Sir *et al.*, 2010; Zhong *et al.*, 2017) confirment le rôle de la HBx dans l'induction du flux autophagique incomplet. Il a par ailleurs été montré que dans un contexte d'expression transitoire et d'expression stable du VHB et *in vivo*, la fusion des autophagosomes avec les lysosomes est bloquée. De plus, le VHB provoque une diminution de l'expression de la protéine Rab7. Cette diminution pourrait expliquer le mécanisme par lequel le VHB inhibe la fusion des autophagosomes aux lysosomes (Figure 1.14) (Zhou *et al.*, 2016).

Cependant, d'autres études ont confirmé que le VHB (virons, AgHBs) est dégradé dans les autolysosomes (Lin *et al.*, 2019a; Lin *et al.*, 2019b; Xie *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2015b). D'une part, il a été proposé que la réplication du VHB dans les cellules (HepAD38 ou HepG2.2.15) induit la production des ROS, par conséquent, la protéine AMPK est activée. Cette activation favorise la dégradation du VHB par la voie autophagique (Xie *et al.*, 2016). D'autre part, il a été suggéré que la dégradation du VHB est médiée par le complexe Rab7- PLEKHM1-LC3 et le complexe SNAP29-VAMP8 (Lin *et al.*, 2019a; Lin *et al.*, 2019b).



Figure 1.14: Induction de l'autophagie par la protéine S-AgHBs et la protéine HBx du VHB La protéine HBx induit l'autophagie à travers différentes voies (encadrées et colorées en marron). La protéine SHBs (S-AgHBs) active également l'autophagie à travers l'induction du stress de réticulum endoplasmique et ainsi une réponse UPR. La fusion des autophagosomes avec les lysosomes peut être inhibée par le VHB. Cette réaction est médiée par la protéine Rab7. La protéine HBx peut altérer l'acidification des lysosomes et des autolysosomes. Adapté de Zhang, 2020, seulement la partie VHB qui a été conservé.

• L'autophagie et le cycle de réplication du VHB

Plusieurs études ont montré l'effet proviral de l'autophagie sur le cycle de réplication du VHB, soit sur la réplication de l'ADN viral (Gao *et al.*, 2019; Sir *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2020; Zhong *et al.*, 2017), soit sur l'enveloppement et/ou la sécrétion du VHB (Doring & Prange, 2015; Doring *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2011). Des études ont démontré que la suppression de l'autophagie par la 3-Methyladenine (3MA), la wortmannine (inhibiteurs de l'autophagie), ou par des siRNA dirigés contre des protéines autophagiques importantes (ATG7, ATG5...), affecte négativement le cycle de réplication du VHB. En effet, le groupe de recherche (Sir *et al.*, 2010) a traité des cellules exprimant le VHB avec l'inhibiteur de l'autophagie, 3-Methyladenine, (inhibiteur du PI3KC3). Leurs résultats montrent une diminution significative de la réplication de l'ADN viral. Pour confirmer la spécificité de leurs résultats, ils ont utilisé des siRNA contre Vps34 et ATG7. Leurs résultats confirment la suppression de la réplication de l'ADN dans ces conditions. Ce qui

confirme l'effet proviral de l'autophagie sur la réplication d'ADN du VHB. Dans la même étude, les auteurs ont évalué l'effet de l'autophagie sur le niveau des ARN viraux du VHB en traitant les cellules avec du 3MA ou un siRNA contre ATG7. Leurs résultats révèlent un effet marginal sur l'ARN et l'AgHBs du VHB et aucun effet sur la protéine core.

Il a été montré que la voie de signalisation ROS-JNK est importante pour la formation des autophagosomes ainsi que pour la réplication du VHB. Il a été expliqué que l'inhibition, en utilisant des différentes doses d'inhibiteur de la voie JNK-ROS, diminue le niveau d'ADN viral. Cependant, aucun effet significatif n'a été observé sur le niveau d'ARN viral. Cela confirme le rôle positif de l'autophagie sur la réplication de l'ADN du VHB. Cette étude a été réalisée *in vitro* dans des cellules HepG2 et des cultures primaires d'hépatocytes humains (Zhong *et al.*, 2017).

Les différentes études mentionnées précédemment défendent l'hypothèse selon laquelle l'autophagie est majoritairement impliquée dans la réplication de l'ADN viral du VHB (Gao et al., 2019; Sir et al., 2010; Wang et al., 2020; Zhong et al., 2017). Cependant, une étude a proposé que l'autophagie agisse positivement plutôt sur l'enveloppement du VHB. En effet, le groupe de Yuan, (Li et al., 2011), a constaté une diminution de la concentration en virions dans les surnageants de culture après le traitement des cellules exprimant le VHB avec du 3MA. Les mêmes observations ont été confirmées par l'utilisation de différents siRNA, ciblant notamment l'autophagie (Bécline 1 et ATG5) et la voie UPR (PERK, IRE1ALPHA, ATF6). Ces résultats permettent aux auteurs de déduire que l'autophagie a un effet proviral sur l'enveloppement et/ou la sécrétion des virions. Pour trancher entre un effet positif sur l'enveloppement et/ou la sécrétion, ils ont traité les cellules avec du 3MA, ou des siRNA ciblant la Bécline 1 et ATG5. Ensuite, ils ont utilisé un anticorps anti-AgHBs pour précipiter les virions. Les résultats des deux traitements montrent une diminution de concentration pour les virions intracellulaires et extracellulaires, et aucun effet sur les nucléocapsides intracellulaires (Li et al., 2011). Cela permet de confirmer l'effet proviral de l'autophagie sur l'enveloppement du VHB. Par ailleurs, il a été démontré que le complexe d'élongation ATG5-ATG12/ATG16L1 est important pour l'assemblage/stabilité des nucléocapsides du VHB. Cependant le système de conjugaison LC3II semble ne pas être impliqué dans cette étape du cycle de réplication du VHB (Doring & Prange, 2015; Doring et al., 2018).

En conclusion, l'autophagie joue un rôle proviral sur le cycle de réplication du VHB. Cependant la nature des effets proviraux (rôle dans la réplication de l'ADN, l'assemblage des capsides, l'enveloppement des capsides) n'a pas atteint de consensus, et pourrait dépendre des modèles cellulaires ainsi que des génotypes utilisés.

9 LES VÉSICULES EXTRACELLULAIRES

La présence des vésicules extracellulaires (VE) de la cellule a été découverte il y a plus 50 ans (Hessvik & Llorente, 2018; Wolf, 1967). Ils existent principalement trois types de VE dépendamment de leur mécanisme de sécrétion et de leur taille : i) les exosomes, ii) les microvésicules (microparticules), iii) les corps apoptotiques (Figure 1.15) (Gyorgy *et al.*, 2011). Les microvésicules et les corps apoptotiques sont sécrétés directement à partir de la membrane plasmique des cellules. Pour les besoins de cette thèse, nous allons nous intéresser uniquement aux exosomes.



Figure 1.15: Représentation schématique des vésicules extracellulaires

Le schéma représente les différentes vésicules extracellulaires sécrétées par les cellules, soient les exosomes, les microvésicules et les corps apoptotiques (Gyorgy *et al.*, 2011)

9.1 Les exosomes

9.1.1 Définition et historique

Les exosomes sont des nanovésicules extracellulaires dont la taille varie de 50 nm à 100 nm. L'origine de ces vésicules est la voie endosomale. Elles dérivent des vésicules intraluminales (ILVs) présentes dans les corps multivésiculaires (MVB) ou endosomes tardifs. Les exosomes sont libérés dans le milieu extracellulaire à la suite de la fusion des endosomes tardifs (corps multivésiculaires) avec la membrane plasmique (Inoue *et al.*, 2018; Le Lay *et al.*, 2018; Raposo
& Stoorvogel, 2013). Les corps multivésiculaires (MVB) fusionnent soit avec des lysosomes pour former des endo-lysosomes entraînant la dégradation du contenu, soit avec la membrane plasmique pour libérer les exosomes (Figure 1.16) (Harding *et al.*, 2013). Les exosomes sont sécrétés dans le milieu de culture cellulaire *in vitro*. De plus, ils sont également libérés *in vivo* dans divers fluides corporels tels que le sérum, les urines et la salive (Angélique, 2012).

Les exosomes peuvent contenir des lipides, des protéines, et des ARN, incluant les microRNAs (Zhang *et al.*, 2019). Ils sont impliqués dans la communication intercellulaire (Raposo & Stoorvogel, 2013). Les exosomes expriment différentes protéines, qui peuvent être des marqueurs potentiels permettant de distinguer les vésicules extracellulaires. Parmi les protéines enrichies dans les exosomes on trouve les protéines ALIX, TSG101, HSP70 et les tétraspanines telles que CD63, CD81 et CD9 (Mathivanan *et al.*, 2010; Mathivanan & Simpson, 2009; Record *et al.*, 2014). Ces dernières se sont communes aux exosomes cependant on trouve d'autres qu'ils sont spécifiques aux types cellulaires (Mathivanan *et al.*, 2012; Mathivanan *et al.*, 2010; Stremersch *et al.*, 2016; Thery *et al.*, 2002b) par exemple les exosomes secrétés des cellules NK expriment la perforine (Lugini *et al.*, 2012) et les cellules dendritiques secrètent des exosomes qui expriment CMH-classe II (Munich *et al.*, 2012).



Figure 1.16: Représentation schématique de la sécrétion des exosomes dans le milieu extracellulaire Le contenu des endosomes précoces est séquestré dans les ILVs des MVB. Les MVB fusionnent soit avec les lysosomes pour une dégradation, soit avec la membrane plasmique pour la libération des exosomes à l'extérieur de la cellule. Adapté de Mathivanan *et al.*, 2010.

Le processus de la sécrétion des nanovésicules a été observé pour la première fois dans des réticulocytes de rat en 1983 (Harding *et al.*, 1983). Plus tard, en 1985, des observations similaires ont été faites sur des réticulocytes de mouton (Pan et al., 1985). Deux ans plus tard (1987), le nom « exosome » a été attribué à ces nanovésicules par Rose Johnstone (Johnstone, 2005; Johnstone *et al.*, 1987). Les exosomes ont été considérés, au début de leur découverte, comme étant des déchets cellulaires (Johnstone *et al.*, 1987). Par la suite, d'autres rôles importants ont été déterminés.

9.1.2 Fonctions biologiques des exosomes

Les exosomes sont impliqués dans différents processus biologiques tels que l'homéostasie cellulaire (Desdin-Mico & Mittelbrunn, 2017), la présentation antigénique et l'inflammation (Gurunathan *et al.*, 2019). Les exosomes affectent également différents processus pathologiques tels que le cancer. Le rôle des exosomes dans les processus physiologiques et pathologiques est lié à leur aptitude à transférer des ARN, des protéines et des lipides entre les cellules. Ce phénomène contribue à la communication entre les cellules voisines et distantes (Edgar, 2016; Mathivanan *et al.*, 2010; Record *et al.*, 2014).

Les exosomes contribuent à l'homéostasie cellulaire. Ils sont impliqués dans la protection des cellules contre le stress intracellulaire. Ainsi, à la suite d'un stress, la sécrétion des exosomes est augmentée et leur composition est modifiée (Villarroya-Beltri *et al.*, 2014). Par exemple, l'induction de stress du réticulum endoplasmique favorise la formation des MVB et la sécrétion des exosomes (Kanemoto *et al.*, 2016). La réplication du VHB dans les cellules hépatiques modifie l'abondance de 35 protéines dans les exosomes par rapport à des exosomes issues des cellules non infectées (Jia *et al.*, 2017). Cependant, les raisons pour lesquelles la cellule en stress augmente la sécrétion des exosomes ne sont pas bien définies et différentes explications sont proposées : i) L'augmentation de la sécrétion des exosomes pourrait être une voie alternative d'élimination des déchets et des composantes nuisibles à la cellule; ii) les cellules peuvent communiquer aux cellules voisines un état de stress intracellulaire en augmentant la sécrétion des exosomes (Hessvik & Llorente, 2018).

Dans le contexte de la présentation antigénique, il a été montré que les cellules dendritiques sécrètent des exosomes. Ces dernières transfèrent des protéines membranaires, comme le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, à d'autres cellules dendritiques. De plus, elles activent les cellules T CD4+ naïves. Cela permet la propagation de l'antigène et l'amplification de la réponse immunitaire (Nolte-'t Hoen *et al.*, 2009; Thery *et al.*, 2002a; Thery *et al.*, 2002b).

59

Les exosomes sont également des médiateurs de la réponse inflammatoire. Ainsi, différentes cellules immunitaires sécrètent des exosomes à la suite de la détection d'antigènes étrangers. Par exemple, la stimulation des macrophages par des lipopolysaccharides (LPS) provoque la sécrétion d'exosomes par ces cellules et induit la production de TNF- α et IL-6 par des macrophages naïfs (Essandoh *et al.*, 2015). Les cellules immunitaires peuvent aussi recevoir les exosomes sécrétés par d'autres cellules. Par exemple, le traitement, *in vitro* des macrophages par des exosomes isolés de sérum des souris atteintes de colite aiguë induite par le Sulfate de Dextrane Sodique (DSS) cause la production de TNF α (Wong *et al.*, 2016).

Dans le contexte du cancer, les exosomes transfèrent des miARN (micro-ARN) dans le microenvironnement de la tumeur. C'est le cas par exemple du cancer du foie, dans lequel les exosomes contiennent le miR-1247-3p et activent la voie de signalisation intégrine bêta-1/NF-κB dans les fibroblastes. Cela permet la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-8), favorise la propagation du cancer de foie et la métastase pulmonaire de ce cancer (Fang et al., 2018).

9.1.3 Biogenèse et absorption des exosomes

Les exosomes proviennent de la voie endosomale et correspondent, comme mentionné précédemment, aux vésicules intraluminales (ILVs) présentes dans les corps multivésiculaires intracellulaires (Zhang *et al.*, 2019). Deux mécanismes de formation des exosomes ont été décrits en fonction de la dépendance vis-à-vis de la machinerie des ESCRT (Figure 1.17) (Raposo & Stoorvogel, 2013).



Figure 1.17 : Biogenèse des exosomes

Les vésicules intraluminales (ILVs) sont générées par l'invagination de la membrane endosomale selon des mécanismes dépendants ou non des protéines ESCRT. Les ILVs ont deux destinations différentes, elles peuvent fusionner avec des lysosomes pour être dégradées ou fusionnées avec la membrane plasmique pour secréter les exosomes adapté de Edgar, 2016.

La machinerie des protéines ESCRT est importante dans le processus de biogenèse des exosomes. On distingue quatre complexes protéiques ESCRT (ESCRTs -0, -I, -II, -III) ainsi que le complexe Vps4 AAA ATPase (Figure 1.17) (Henne *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2017). Ces complexes sont impliqués à la fois dans la formation des MVB, dans le processus d'invagination aboutissant à la formation des ILVs, et dans la sélection des protéines qui sont incorporées dans les ILVs (Zhang *et al.*, 2019). La machinerie des ESCRT est initiée par une étape de reconnaissance et de séquestration des protéines ubiquitinées dans des domaines spécifiques de la membrane endosomale. Cette étape est réalisée via la sous-unité de liaison à l'ubiquitine de la protéine ESCRT-0. Cette dernière interagit avec les complexes ESCRT-I et ESCRT-II. Ce dernier complexe se combine avec l'ESCRT-III. Cette dernière est impliquée dans le processus de bourgeonnement. Après la formation des ILVs, le complexe ESCRT-III se sépare de la

membrane des MVB grâce à la protéine Vps4 (Figure 1.17) (Henne *et al.*, 2011). L'enrichissement dans les exosomes de certaines protéines ESCRT ou accessoires (ALIX, TSG101), ainsi que des protéines ubiquitinées, suggère que les protéines ESCRT sont impliquées dans le tri des protéines vers les exosomes ainsi que dans la biogenèse des exosomes (Zhang *et al.*, 2019). En effet, les protéines TSG101 et ALIX ainsi que certaines tétraspanines (CD63 et CD81) sont des marqueurs largement utilisés pour caractériser les exosomes (Urbanelli *et al.*, 2019).

Cependant, les mécanismes indépendants de la machinerie des ESCRT pour l'adressage des protéines dans les exosomes font intervenir différents éléments tels que les tétraspanines et la céramide (Raposo & Stoorvogel, 2013).

Les exosomes libérées dans le milieu extracellulaire assurent la communication intercellulaire. Cette communication nécessite l'entrée puis la libération du contenu exosomal dans la cellule réceptrice. Ainsi, les exosomes peuvent pénétrer dans une nouvelle cellule par une interaction ligand-récepteur, fusion avec la membrane plasmique, ou l'endocytose (endocytose clathrine ou calvéoline dépendante et indépendante) (Figure 1.18) (Abudoureyimu *et al.*, 2019; Mulcahy *et al.*, 2014). Il a été montré que le mécanisme d'entrée des exosomes varie selon de type de la cellule réceptrice (Horibe *et al.*, 2018). L'interaction entre les exosomes et les cellules réceptrices peut impliquer des récepteurs intégrines situés sur la surface des exosomes ou des cellules cibles. Il a été montré que les exosomes sécrétés à partir des hépatocytes se fixent sur les hépatocytes et les cellules de types héparines. De plus, les protéoglycanes à héparane sulfate cellulaires sont impliqués lors de la liaison des exosomes sécrétés par les cellules stellaires hépatiques à ce même type cellulaire (cellules stellaires hépatiques) (Chen *et al.*, 2018).



Figure 1.18: Absorption des exosomes par la cellule réceptrice

Les exosomes sécrétés dans le milieu extracellulaire sont directement captés par la cellule receveuse. L'entrée de ces exosomes peut être réalisée par fusion à la membrane plasmique, par endocytose et à travers une interaction ligand-récepteur tiré de Feng *et al.*, 2019.

9.2 Les exosomes et les virus

La cellule augmente la sécrétion d'exosomes en réponse à un stress pour maintenir son homéostasie (Gurunathan et al., 2019; Hessvik & Llorente, 2018). Une infection virale stimule la sécrétion des exosomes. Il a par exemple été montré que l'expression de la protéine HBx du VHB augmente la sécrétion des exosomes dans la cellule (Kapoor et al., 2017). La sécrétion des exosomes et l'activité autophagique permettent à la cellule infectée d'éliminer différentes composantes nuisibles à son homéostasie. Par ailleurs, le contenu des exosomes peut être modifié lors des conditions de stress et de pathologies (Conde-Vancells et al., 2008; Zhang et al., 2018). De plus, la structure et la quantité des protéines et des lipides membranaires d'exosomes changent à la suite des infections (Zhang et al., 2018). Par exemple, des analyses protéomiques des exosomes dérivés des cellules infectées par le VHB révèlent un changement significatif de l'abondance de 35 protéines en présence de la réplication virale du VHB (Jia et al., 2017). Les exosomes et les virus ont en commun plusieurs caractéristiques, telles que la taille et la biogenèse. Par exemple le complexe protéique ESCRT est impliqué dans la biosynthèse des exosomes et de certains virus, comme le VHB (Votteler & Sundquist, 2013). Récemment, il a été démontré que le VHD permet une augmentation de la sécrétion des vésicules extracellulaires et que ces dernières contiennent l'ARN viral et provoquent la sécrétion des cytokines proinflammatoires (TNF-α, IFN-γ, IL-6) des cellules PBMC et des macrophages (Jung *et al.*, 2020). Les exosomes peuvent jouer un rôle antiviral ou proviral (Zhang *et al.*, 2018).

9.2.1 Le rôle antiviral des exosomes

Les exosomes peuvent jouer un rôle antiviral. Cela se produit lorsque les exosomes stimulent la réponse immunitaire en envoyant des signaux aux cellules immunitaires qui vont à leur tour déclencher la réponse immunitaire ciblant l'agent pathogène. Aussi, les exosomes sont capables de transférer des protéines impliquées dans la réponse antivirale. C'est le cas de l'infection par le VIH (Figure 1.19) durant laquelle il a été montré que les exosomes sécrétés par les cellules infectées transportent la protéine cellulaire antivirale APOBEC3G (Khatua *et al.*, 2009).

Les exosomes sont également impliqués dans la réponse antivirale par la diffusion des antigènes viraux afin d'activer une réponse immunitaire contre ce virus. Par exemple, il a été montré que dans le contexte d'une infection par EBV les exosomes contenant des composantes virales et des microRNAs sont capables de médier une communication intercellulaire en transférant leur contenu vers d'autres cellules du système immunitaire (Figure 1.19) (Cellules T, cellules dérivées de monocytes et aussi les cellules B), ce qui permet d'établir une réponse contre le virus et d'augmenter la capacité de prolifération et de différenciation des cellules B (Gutzeit *et al.*, 2014; Pegtel *et al.*, 2010; Rechavi *et al.*, 2009).

Il a été montré que l'ARN viral du VHC est transféré, par le biais des exosomes aux cellules immunitaires non permissives au virus, telles que les cellules dendritiques plasmacytoïdes. Ce transfert de l'ARN virale induit une production de l'IFN alpha (Figure 1.19) (Dreux *et al.*, 2012).

9.2.2 Le rôle proviral des exosomes

Premièrement, le rôle proviral consiste en la transmission entre les cellules de l'infection virale et l'échappement du virus au système immunitaire. Les exosomes peuvent contenir différentes composantes virales (protéines, génome viral, ARNm, microARN). Cela favorise la transmission d''infection virale entre les cellules; par exemple, les exosomes sécrétés par les cellules infectées par le virus T-lymphotrope humain-1 (HTLV-1) contiennent des protéines virales incluant la protéine virale Tax (*Transactivator of pX*) qui est une protéine virale transactivatrice qui contrôle différentes voies cellulaires (Jaworski et al., 2014). Aussi, les exosomes issus de cellules infectées par le virus herpès humain type 6 contiennent des virions matures permettant la transmission de l'infection plus efficacement (Mori et al., 2008).

Certains virus comme les rétrovirus profitent de la voie de biogenèse des exosomes pour favoriser l'enveloppement des particules virales. Il a été montré que les exosomes expriment les mêmes protéines et lipides retrouvés sur les particules virales de rétrovirus. Par conséquent, le VIH-1 exploite les protéines de la biogenèse des exosomes pour l'enveloppement de sa capside et de fait la synthèse de virions matures (Gould *et al.*, 2003; Meng *et al.*, 2015). Ce rétrovirus peut infecter les cellules indépendamment de la présence des protéines virales (comme la gp120) impliquées dans l'étape d'entrée du VIH-1. Cette capacité semble être liée aux exosomes sécrétés par les cellules infectées (Pang *et al.*, 2000). Par ailleurs, il a été montré que différents types de vésicules extracellulaires permettent le transfert des co-récepteurs CCR5 et CXCR4 du VIH-1 vers des cellules qui n'expriment pas ces co-récepteurs (Figure 1.19) (Madison & Okeoma, 2015). Ce transfert peut modifier et élargir le tropisme du VIH-1 (Gould *et al.*, 2003; Madison & Okeoma, 2015). Un autre exemple est le virus herpès humain de type 6 dont les virions ont été observés par microscopie électronique dans les corps multivésiculaires. Il a été montré que ces virions bourgeonnent avec les exosomes à travers la même voie de sécrétion (Mori *et al.*, 2008).

Les virus peuvent utiliser les exosomes pour échapper au système immunitaire. En effet, le système immunitaire ne peut reconnaître les particules virales ou les composantes virales protégées dans des exosomes. Ainsi, la réponse immunitaire à ces composantes virales peut être supprimée (Zhang et al., 2018). Par exemple, le virus de l'hépatite A (VHA) peut être inclu dans des vésicules, ce qui favorise sa sécrétion et sa dissémination dans le foie. Ces vésicules permettent aux virions d'éviter la neutralisation par les anticorps (Feng et al., 2013). Les exosomes provenant des cellules infectées par des virus peuvent aussi contenir des miRNA d'origine virale. Cela aide les virus à échapper au système immunitaire et favorise ainsi leur propagation et leur persistance. C'est l'exemple de l'herpès virus (tel que EBV) (Figure 1.19) (Lagana et al., 2013). Les exosomes issues des cellules hépatiques infectées par le VHC contiennent de l'ARN et des protéines virales (Bukong et al., 2014; Masciopinto et al., 2004). Ces exosomes permettent la transmission du VHC d'une cellule à une autre in vitro (Ramakrishnaiah et al., 2013). Cela permet au virus d'échapper au système immunitaire puisqu'il ne peut pas être neutralisé par les anticorps (Figure 1.19) (Ramakrishnaiah et al., 2013). Les exosomes des cellules infectées par le virus de l'hépatite E (VHE), virus à ARN non enveloppé, contiennent l'ARN du VHE encapsidé. Les anticorps anti-VHE ne pouvant pas neutraliser les exosomes contenant ce virus, ceux-ci sont considérés comme infectieux. (Figure 1.19) (Chapuy-Regaud et al., 2017).



Figure 1.19: Exosomes et Virus

Le VIH, le EBV et les virus des hépatites (VHB, VHC, VHA) représentent des exemples de virus qui détournent les exosomes pour faciliter leur infection, leur propagation et leur pathogenèse. Les exosomes contiennent différentes composantes virales selon le virus comme indiqué dans le schéma (Khan *et al.*, 2017).

9.3 Les exosomes et le VHB

Un autre virus qui interfère avec les exosomes est le VHB. En effet, les exosomes participent au cycle de réplication du VHB. Des évidences montrent que la maturation et le bourgeonnement du VHB dépendent des vésicules intraluminales des MVB. Il a été montré que les protéines d'enveloppe du VHB colocalisent avec les protéines ALIX et VPS4B reliées aux corps multivésiculaires et que l'inhibition d'expression de l'une de ces protéines bloque la production et/ou la sécrétion des virions enveloppés du VHB (Kian Chua *et al.*, 2006; Lambert *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2007). De plus, il a été démontré que la protéine core et la protéine d'enveloppe L-AgHBs du VHB interagissent avec la protéine appelée « gamma2-adaptine » et

l'ubiquitine ligase Nedd4. Cette interaction permet le transport des structures virales à travers la voie endosomale tardive (Hartmann-Stuhler & Prange, 2001; Rost *et al.*, 2006).

Par ailleurs, les exosomes modulent la réponse immunitaire durant l'infection par le VHB. En effet il a été montré que les exosomes sécrétés par les hépatocytes exprimant le VHB induisent l'expression du ligand NKG2D dans les macrophages (Kouwaki *et al.*, 2016). Cela permet l'activation des cellules NK. Les cellules HepG2-NTCP infectées par le VHB montrent une augmentation de concentration de miR-21 et miR-29a dans les exosomes. Ces derniers inhibent l'activité des cellules NK en diminuant l'expression d'IL-12 (Kouwaki *et al.*, 2016). Il a été montré que le miR-3 du VHB se présente dans les exosomes isolées des cellules HepG2.2.15 (Yang *et al.*, 2017b). Ce miR-3 du VHB cible un site bien spécifique du transcrit de 3,5 kb du VHB, ce qui résulte en une diminution du niveau d'ARNpg et de la protéine core, et donc une diminution de la réplication du VHB (Yang *et al.*, 2017b).

Le transfert de résistance au VHB des cellules hépatiques non parenchymale aux hépatocytes est induit par l'interféron-alpha et médié par les exosomes (Li *et al.*, 2013). L'étude de (Yao *et al.*, 2018) a proposé un mécanisme expliquant ce transfert de résistance par les exosomes. Ils ont expliqué que les macrophages sécrètent des exosomes qui contiennent des molécules antivirales (telle que l'interféron-alpha.). Ces exosomes sont endocytés par les hépatocytes de façon dépendante de la clathrine ou par macropinocytose. Ces exosomes sont acheminés par des endosomes précoces vers les endosomes tardifs ou les MVB. Les exosomes fusionnent alors avec les vésicules intraluminales dans les MVB pour transférer leur contenu. Les vésicules intraluminales libèrent ensuite les molécules antivirales par fusion avec la membrane des MVB dans le cytoplasme, cela inhibe la réplication du VHB.

Différentes composantes virales du VHB se retrouvent dans les exosomes. L'ARN et l'ADN viral du VHB sont présents dans des exosomes issues des sérums de patients chroniquement infectés par le VHB (Kouwaki *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2017c). Certaines protéines du VHB peuvent également être présentes dans les exosomes (l'HBx, l'AgHBs, l'HBc, et la polymérase) (Jia *et al.*, 2017; Kapoor *et al.*, 2017; Kouwaki *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2017c). Cela semble permettre la transmission de l'infection du VHB entre les cellules et ainsi favoriser la pathogenèse du VHB (Jia *et al.*, 2017; Kapoor *et al.*, 2017; Kouwaki *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2017c). Les acides nucléiques du VHB contenu dans les exosomes ont été détectés dans les cellules « natural killer » (NK) de patients chroniquement infectés par le VHB (Yang *et al.*, 2017c). Dans ce sens, il a été montré que les exosomes dérivés du sérum des patients chroniquement infectés par le VHB perturbent l'activité cytotoxique des cellules NK, suppriment l'expression du récepteur NKp44, de

67

l'IFN-γ, et du facteur de nécrose tumorale (TNFα) (Yang *et al.*, 2017c). En utilisant des cellules HepAD38 qui produisent du VHB, il a été montré que ces cellules secrètent des exosomes enrichis en protéines du complexe de protéasome 26S incluant la PSMC1 « 26S protease regulatory subunit 4 », la PSMC2 « 26S protease regulatory subunit 7 », la PSMD1 « 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 », la PSMD7 « 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7 » et la PSMD14 « 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7 ». Ce contenu est transmis vers d'autres cellules à travers les exosomes et provoque l'inhibition de la sécrétion d'IL-6 par les monocytes ce qui favorise la réplication du VHB et probablement la persistance et la pathogenèse virales (Jia *et al.*, 2017).

En conclusion, les exosomes jouent un double rôle lors de l'infection par le VHB. D'une part, les exosomes ont un rôle antiviral contre le VHB. En effet, les exosomes peuvent inhiber la prolifération ou la réplication du VHB, en transmettant des molécules antivirales entre les cellules. Ces nanovésicules activent la réponse immunitaire innée contre le VHB en améliorant les fonctions des cellules immunitaires telles que les monocytes-macrophages et les cellules NK. D'autre part, les exosomes contenant l'ADN, l'ARN et les protéines virales du VHB favorisent l'infection des cellules voisines par le VHB mais aussi elles exercent un rôle proviral par la modulation de certains éléments immunologiques.

10 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

À l'issue de cette revue de la littérature, nous pouvons tirer qu'un stress cellulaire active l'autophagie, mais aussi induit la sécrétion des vésicules extracellulaires y compris les exosomes. De plus, nous avons constaté que la liste des virus qui profitent de l'autophagie et des exosomes est bien large. Ainsi, l'infection par le VHB induit un stress cellulaire qui stimule l'autophagie, mais également la sécrétion des exosomes. Plusieurs études ont montré le rôle proviral de l'autophagie vis-à-vis du VHB et l'interaction de ce dernier avec la voie de biosynthèse des exosomes. Il est évident que le VHD est un virus satellite du VHB et que leurs cycles de réplication sont étroitement liés. Cependant, il n'existe dans la littérature aucune donnée sur l'autophagie et le VHD et très récemment, au moment de l'écriture de ma thèse, une étude a postulé que l'infection par le VHD induit une production des vésicules extracellulaires. Nous avons émis l'hypothèse que le VHD, lui aussi, active et bénéficie de l'autophagie et provoque l'augmentation de la sécrétion des exosomes qui favorisent la propagation du VHD en absence du VHB. Le choix d'étudier ces deux processus cellulaires dans le contexte d'infection virale par le VHD, repose sur le fait que la présence du VHD en co-infection et surinfection avec le VHB accélère la progression de la maladie vers un cancer du foie et aussi l'absence des traitements efficaces contre le VHD. D'où l'importance de comprendre les facteurs cellulaires et viraux de développement de la maladie pour trouver des pistes thérapeutiques potentielles.

Mon projet de recherche comporte par conséquent deux parties. Dans un premier temps, établir le lien entre le VHB, le VHD, et l'autophagie pour laquelle nous avons émis les trois objectifs suivants :

- a) Confirmer les liens entre l'autophagie et le VHB dans notre modèle cellulaire ;
- b) Déterminer les liens entre l'autophagie et le VHD dans notre modèle cellulaire ;
- c) Déterminer l'effet de l'autophagie dans un modèle de co-infection.

N. B. Les résultats de ces 3 objectifs font l'objet de la première publication (Chapitre 2 de ce manuscrit)

Dans un deuxième temps, nous voulions établir le lien entre le VHD et les exosomes. Sur la base de différentes observations préliminaires *in vitro* de propagation de l'AgHD entre les cellules hépatiques en absence du VHB et plus précisément de l'AgHBs (réalisées dans notre laboratoire), nous avons émis l'hypothèse que la réplication du VHD induit une augmentation de la sécrétion des exosomes spécifiques au VHD et permet de propager et d'initier la réplication du VHD dans les cellules voisines en absence du VHB. Afin de répondre à cette hypothèse, nous avons fixé les objectifs suivants :

- a) Déterminer l'effet de l'expression du VHD sur la sécrétion des vésicules extracellulaires;
- b) Déterminer si une proportion des exosomes sécrétés par des cellules transfectées exprime les composantes virales du VHD ;
- c) Déterminer si les exosomes sont capables de transmettre de matériel viral du VHD aux cellules hépatiques naïves.

N. B. Les résultats de ces 3 objectifs font l'objet d'un manuscrit en préparation (Chapitre 3 de ce document).

L'ensemble des travaux présentés dans ce manuscrit, amélioreront les connaissances sur le lien entre les VHB et VHD et l'autophagie soit individuellement, soit en contexte de coexpression. Elle permettra également de comprendre l'interaction du VHD avec les exosomes et leur implication dans la propagation du VHD indépendamment du VHB. **CHAPITRE 2: PREMIÈRE PUBLICATION**

Hepatitis Delta Virus Alters the Autophagy Process to Promote Its Genome Replication

doi : 10.1128/JVI.01936-19

Marwa Khabir^a, Asma Zahra Aliche^a, Camille Sureau^b, Matthieu Blanchet^a, Patrick Labonté^a

^aINRS – Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, INRS, Laval, Canada ^bInstitut National de laTransfusion Sanguine, Paris, France

Résumé

Il a été démontré qu'un nombre important de virus subvertissent l'autophagie pour favoriser leur propre réplication. Des publications récentes ont rapporté l'effet proviral de l'induction de l'autophagie sur la réplication du virus de l'hépatite B (VHB). Le virus de l'hépatite delta (VHD) est un virus défectueux, un satellite obligatoire occasionnel du VHB. Cependant, aucun travail antérieur n'a étudié la relation entre l'autophagie et le VHD. Dans cet article, nous analysons l'impact de l'expression d'éléments propres au VHB et au VHD sur l'autophagie. Réciproquement, nous présentons également des résultats sur l'effet de l'autophagie sur les cycles de réplication du VHB et du VHD, individuellement, ou dans le cadre du co-expression. Nous démontrons que l'AgHBx et l'AgHBs induisent des étapes précoces de l'autophagie, mais qu'ils bloquent le flux. Il convient de noter que les deux isoformes de la protéine VHD, la courte AgHD (S-AgHD) et la longue AgHD (L-AgHD), peuvent également favoriser efficacement l'accumulation d'autophagosomes et perturber le flux autophagique. En utilisant la technologie de "CRISPR-Cas9" pour générer des cellules « knockout » (invalidation génique) spécifiques, nous démontrons que la machinerie de l'autophagie, en particulier les protéines impliquées dans l'étape d'élongation (ATG7, ATG5 et LC3), est importante pour l'assemblage / I sécrétion du VHB sans affecter le niveau d'ADN intracellulaire du VHB. Le « knockout » des protéines ATG5 et ATG7 a diminué le niveau d'ARN du VHD intracellulaire dans les cellules Huh7 et HepG2.2.15 sans effet supplémentaire sur l'assemblage/la sécrétion du VHD. Par conséquent, nous concluons que le VHB et le VHD ont évolué pour utiliser de façon différente la machinerie de l'autophagie afin de promouvoir leurs réplications.

Contribution des auteurs

Marwa Khabir : Conception et réalisation des manipulations, préparation des figures, rédaction et révision du manuscrit

Asma Zahra Aliche : réalisation de immunobuvardage de type western pour la Figure 4A et la Figure 5A et B

Camille Sureau : Révision du manuscrit

Matthieu Blanchet : Conception des expériences, révision du manuscrit

Patrick Labonté: Conception des expériences, préparation des figures et révision du manuscrit



Hepatitis Delta Virus Alters the Autophagy Process To Promote Its Genome Replication

Marwa Khabir,^a Asma Zahra Aliche,^a Camille Sureau,^b Matthieu Blanchet,^a Patrick Labonté^a

^aINRS-Institut Armand-Frappier, INRS, Laval, Canada ^bInstitut National de la Transfusion Sanquine, Paris, France

Journal of

SOCIETY FOR MICROBIOLOGY

AMERICAN

ABSTRACT A substantial number of viruses have been demonstrated to subvert autophagy to promote their own replication. Recent publications have reported the proviral effect of autophagy induction on hepatitis B virus (HBV) replication. Hepatitis delta virus (HDV) is a defective virus and an occasional obligate satellite of HBV. However, no previous work has studied the relationship between autophagy and HDV. In this article, we analyze the impact of HBV and HDV replication on autophagy as well as the involvement of the autophagy machinery in the HDV life cycle when produced alone and in combination with HBV. We prove that HBxAg and HBsAg can induce early steps of autophagy but ultimately block flux. It is worth noting that the two isoforms of the HDV protein, the small HDAg (S-HDAg) and large HDAg (L-HDAg) isoforms, can also efficiently promote autophagosome accumulation and disturb autophagic flux. Using CRISPR-Cas9 technology to generate specific knockouts, we demonstrate that the autophagy machinery, specifically the proteins implicated in the elongation step (ATG7, ATG5, and LC3), is important for the release of HBV without affecting the level of intracellular HBV genomes. Surprisingly, the knockout of ATG5 and ATG7 decreased the intracellular HDV RNA level in both Huh7 and HepG2.2.15 cells without an additional effect on HDV secretion. Therefore, we conclude that HBV and HDV have evolved to utilize the autophagy machinery so as to assist at different steps of their life cycle.

IMPORTANCE Hepatitis delta virus is a defective RNA virus that requires hepatitis B virus envelope proteins (HBsAg) to fulfill its life cycle. Thus, HDV can only infect individuals at the same time as HBV (coinfection) or superinfect individuals who are already chronic carriers of HBV. The presence of HDV in the liver accelerates the progression of infection to fibrosis and to hepatic cancer. Since current treatments against HBV are ineffective against HDV, it is of paramount importance to study the interaction between HBV, HDV, and host factors. This will help unravel new targets whereby a therapy that is capable of simultaneously impeding both viruses could be developed. In this research paper, we evidence that the autophagy machinery promotes the replication of HBV and HDV at different steps of their life cycle. Notwith-standing their contribution to HBV release, autophagy proteins seem to assist HDV intracellular replication but not its secretion.

KEYWORDS hepatitis delta virus (HDV), hepatitis B virus (HBV), autophagy, viral replication, chronic infection, ATG5

A utophagy is a catabolic pathway that leads to the degradation of damaged organelles, protein aggregates, and intracellular microorganisms (1). More than 30 autophagy (ATG) proteins participate in the autophagy process that begins, upon induction, by the formation of a double-membrane phagophore that will, upon elongation and maturation, engulf cytoplasmic contents in the so-called autophagosome. The autophagy process is completed by the degradation and recycling of the engulfed

February 2020 Volume 94 Issue 4 e01936-19

Journal of Virology

Citation Khabir M, Aliche AZ, Sureau C, Blanchet M, Labonté P. 2020. Hepatitis delta virus alters the autophagy process to promote its genome replication. J Virol 94:e01936-19. https://doi.org/10.1128/JVI.01936-19. Editor J.-H. James Ou, University of Southern

California Copyright © 2020 American Society for Microbiology. All Rights Reserved. Address correspondence to Patrick Labonté,

patrick.labonte@iaf.inrs.ca. Received 15 November 2019

Accepted 15 November 2019 Accepted manuscript posted online 20 November 2019

Published 31 January 2020

Khabir et al.

materials by lysosomal enzymes following the fusion of autophagosomes with lysosomes (2).

The elongation and maturation of the phagophore require two ubiquitin-like conjugation systems. The first results in the formation of the autophagy elongation complex ATG5-12/16L1. In this process, ATG7, an E1 ubiquitin-like enzyme, captures ATG10, an E2 ubiquitin-like enzyme, and transfers it to ATG12 in order to trigger ATG5-ATG12 conjugation (3). To become functional, the ATG5-ATG12 conjugate requires a stoichiometric association with ATG16L1 (4). The second conjugation system allows the covalent addition of phosphatidylethanolamine (PE) to microtubuleassociated protein 1 light chain 3 (LC3). The process is initiated by the cleavage of LC3 near its C terminus by the cysteine protease ATG4B. ATG7 then transfers ATG3 (E2 ubiquitin-like enzyme) to LC3 to form an active intermediate (ATG3-LC3). The recruitment of this intermediate at the phagophore permits the addition of PE by ATG3 with the help of the ATG5-12/16L1 complex, which acts as an E3 ubiguitin-like enzyme (5, 6). Therefore, the association of the elongation complex with the autophagosomal membrane dictates the site of LC3II formation (7, 8). The conjugation of the PE group to LC3 triggers its insertion in the inner and outer membranes of the autophagosome, where it is required for maturation. It should be noted that in this study, LC3 is referred to as LC3B, the most studied of the six LC3/GABARAP homologs.

Recently, several viruses, including hepatitis B virus (HBV) (9–14), have been demonstrated to subvert the antimicrobial catabolic activity of autophagy (xenophagy) by blocking autophagic flux and by using the autophagy proteins to promote their replication (15–17). Hence, the regulation of autophagy could represent a favorable antiviral target against a wide variety of viruses.

Hepatitis delta virus (HDV) is a defective virus that uses the envelope proteins of HBV to form its infectious particles (18). The genome of HDV is a circular, negative-strand RNA containing one open reading frame that codes for two isoforms of HDAg. The 24-kDa small HDAg (S-HDAg) isoform is expressed early in infection and believed to enhance the replication of the viral genome (19). Later in infection, the host double-stranded RNA adenosine deaminase (ADAR1) edits the amber stop codon (UAG) to a tryptophan codon (UGG). This leads to the C-terminal addition of 19 amino acids and, in turn, to the large isoform (27 kDa) of the protein (L-HDAg) (20). This extension contains a nuclear export signal (NES) and a prenylation motif (CXXX) (21, 22). These modifications have been demonstrated to initiate the formation and the secretion of infectious viral particles (23), notably by enabling the interaction between L-HDAg and S-HBsAg (23–25).

To date, no studies on the interplay between autophagy and the replication of HDV have been reported. Since HDV can propagate only in the presence of HBV and the autophagy machinery promotes HBV replication (11, 14, 26), we needed to assess to which extent autophagy was able to interfere with the HDV life cycle. In the present study, the induction of autophagy and its impact on HBV and HDV replication were analyzed and compared in cells expressing these viruses independently or simultaneously. Our results testify that HBV and HDV hijack the autophagy machinery to promote their replication at different steps of their life cycle.

RESULTS

HBsAg and HBxAg expressions induce the accumulation of autophagosomes in Huh7 cells. Although a consensus has emerged on the ability of HBV to induce autophagy (reviewed in reference 27) and to benefit from its machinery (11), divergent findings indicate that either HBxAg or HBsAg is responsible for induction (9, 14). As such, we started our research by evaluating the induction of autophagy upon transfection with plasmids encoding the complete HBV genome of serotype ayw3 (genotype D) [pCIHBenv(+)] or an envelope-deficient expression vector [pCIHBenv(-)] (Fig. 1A). Interestingly, both plasmids increase the level of intracellular LC3II (72 h posttransfection), a marker of autophagosome formation. Aside from HBsAg, this result suggests that at least one viral protein induces LC3II accumulation. As expected, the autophagy

February 2020 Volume 94 Issue 4 e01936-19

Journal of Virology



FIG 1 HBsAg and HBxAg expressions induce the accumulation of autophagosomes in Huh7 cells. (A) Huh7 cells were transfected with pClneo, pClHBenv(+), or pClHBenv(-) or treated for 24 h with rapamycin (Rap) (200 nM). Seventy-two hours after transfection, the levels of LC3II, p62, and β -actin were evaluated by Western blotting. (B) Huh7 cells were evaluated by Western blotting. Cells transfected with pClneo, pClHBs-Flag, or pClHBs-Flag. After 72 h of transfection, the levels of LC3II, p62, and β -actin were evaluated by Western blotting. (B) Huh7 cells were evaluated by Western blotting. Moreover, the expressions of HBxAg and HBsAg were verified by Western blotting using an anti-Flag antibody. Cells transfected with pClneo were treated or not with rapamycin. (C) Huh7 cells were cotransfected with pClneo and peGFP-LC3 were treated with rapamycin (100 μ M) for 3 h. At 72 h posttransfection, cells were fixed and stained with an anti-Flag antibody (red) or DAPI (blue). (D) The numbers of GFP-LC3 up or pClHBs-Flag, expressing the HBV proteins (S-HBsAg or HBsAg) through a cytomegalovirus (CMV) promoter (E), or the plasmid pClneo, pTHB2.7x(-) (L-M-S), or pT7HB2.7 (L-M-S-X), expressing the HBV envelope proteins and HBxAg from HBV endogenous promoters (F). The percentage of GFP-LC3-positive cells with punctate LC3 was calculated in transfected cells at 72 h posttransfected set for HBX-Flag.

inducer rapamycin also increases LC3II accumulation. We equally noticed that the level of p62, a protein degraded primarily through autophagy, was increased upon HBV expression, suggesting a disruption of autophagic flux. To identify more precisely which HBV proteins were actually responsible for modulating the autophagy process and because several reports identified HBsAg and HBxAg as autophagy inducers, we cloned

February 2020 Volume 94 Issue 4 e01936-19

these two genes into pClneo in fusion with a C-terminal Flag tag. The transient expression of the tagged proteins in Huh7 cells was confirmed by Western blotting using an anti-Flag antibody (Fig. 1B). We also noticed that both S-HBsAg and HBxAg expression induced increased LC3II and p62, suggesting autophagosome accumulation with an alteration in autophagic flux. To confirm autophagosome accumulation, we visualized LC3 punctum formation using confocal microscopy upon cotransfection of Huh7 cells with plasmids encoding green fluorescent protein (GFP)-LC3 and S-HBsAg or HBxAg or the pClneo plasmid as a control. Our results showed that both S-HBsAg and HBxAg from serotype ayw3 were able to trigger the accumulation of autophagosomes (Fig. 1C to E). It is worth noting that the ability of HBsAg and HBxAg to induce such accumulation seems to be additive when the viral proteins are expressed under the control of endogenous HBV promoters (Fig. 1F).

The autophagy machinery is required for HBV maturation/secretion. To confirm the previously reported proviral effect of autophagy on the HBV life cycle, we used the well-established HepG2.2.15 cell line that harbors four tandem HBV genomic DNA copies of genotype D (ayw serotype) in its genome. HepG2.2.15 cells constitutively express HBV proteins and produce viral particles (28). As illustrated in Fig. 2A and B, the level of autophagosomes is elevated in HepG2.2.15 compared to HepG2 cells. This is likely due to the constitutive expression of HBV proteins. The pharmacological induction of autophagy with rapamycin (50 nM) for 48 h had no effect on the level of intracellular HBV RNA (Fig. 2C). Conversely, a >4-fold increase in HBV extracellular DNA was observed (Fig. 2D), without any significant influence on HBV RNA levels and subviral particle secretion (Fig. 2C and E). On balance, these results indicate that autophagy induction enhances the maturation/secretion of HBV infectious particles rather than the replication of its genome. To confirm these results, the replication of HBV was evaluated in HepG2.2.15 cells with a knockout for ATG7, ATG5, or LC3 (three autophagy proteins were involved in autophagosome formation and expansion). The knockout of these genes was performed via lentiviral delivery of CRISPR-Cas9 guide RNA (gRNA) constructs. Following transduction, knockout cell populations were enhanced by puromycin selection for 9 days, and the efficiency of the different knockouts was evaluated by Western blotting (Fig. 2F). Using this procedure, four HepG2.2.15 derivative cell populations (mock, ATG7 knockout [ATG7-KO], ATG5-KO, and LC3-KO) were obtained (Fig. 2F). As expected, ATG5-KO and ATG7-KO cells lost their ability to lipidate LC3I since both proteins were involved in the conjugation process of LC3. Likewise, the absence of ATG7 in ATG7-KO cells prevented ATG5 and ATG12 conjugation (Fig. 2F). We then measured the intracellular HBV RNA levels and the HBV extracellular virion concentrations in knockout HepG2.2.15 cells. Like the pharmacological activation of autophagy, the inhibition of autophagy did not have a significant effect on intracellular HBV RNA and DNA levels (Fig. 2G and H). However, the concentration of extracellular HBV virions decreased in LC3-KO, ATG5-KO, and ATG7-KO cells (Fig. 2I). In line with the data in Fig. 2D, these results provide evidence for the importance of the autophagy machinery for the accumulation of HBV virions in cell supernatants. They equally support previous reports that suggest that autophagy proteins are involved in nucleocapsid formation and/or envelopment (11, 14). Interestingly, a minor yet significant decrease in HBsAg secretion was observed in HepG2.2.15 KO cells. This indicates that the autophagy machinery could have participated in subviral particle secretion, although the induction of autophagy by rapamycin treatment did not enhance subviral particle secretion (compare Fig. 2E and J).

Hepatitis delta virus replication induces autophagosome accumulation in Huh7 cells. Next, we assessed whether HDV replication was capable of triggering LC3 lipidation. This was explored by using Western blotting (Fig. 3A, D, and E) and confocal microscopy (Fig. 3B and C). To this end, Huh7 cells were transfected with pSVLD3. The latter is a plasmid that contains the complete HDV genome and is sufficient to initiate rolling-cycle replication of the viral genome (29), with or without the plasmid pT7HB2.7 encoding the three forms of HBV envelope proteins. The results indicate that HDV is

February 2020 Volume 94 Issue 4 e01936-19

Autophagy Promotes HBV and HDV Replication

Journal of Virology



FIG 2 Autophagy machinery is required for HBV maturation/secretion. (A and B) HepG2.2.15 and HepG2 cells were transfected with peGFP-LC3 for 72 h. The nuclei were stained with DAPI (blue). The numbers of GFP-LC3 puncta per cell were calculated (*n* = 74). (C to E) HepG2.2.15 cells were treated or not with HBV RNA levels were measured by RT-qPCR. For monitoring the release of HBV virions, Dane particles from supernatants were immunoprecipitated with anti-preS1 antibody and protein A/G beads, and the viral genomes present in the virions were analyzed by qPCR. The release of HBSAg in the cell supernatants (SupHBsAg) was analyzed by an ELISA. The RT-qPCR, qPCR, and ELISA results are presented as relative units (RU) and compared to values for untreated HepG2.2.15 cells. Error bars show the standard errors of the means from four experiments, measured in triplicate. (F) HepG2.2.15 cells were transduced with lentivirus preparations targeting LC3, ATG5, and ATG7 for 9 days. The expression levels of LC3, ATG5, ATG7, and *B*-actin were verified by Western blotting. (G) Intracellular HBV RNAs were quantified by RT-qPCR. (H) Intracellular HBV DNAs were quantified by qPCR. (I) The extracellular HBV virions were analyzed in quadruplicate under each condition. RU, relative units; ns, not significant.

February 2020 Volume 94 Issue 4 e01936-19



FIG 3 Hepatitis delta virus replication induces autophagosome accumulation in Huh7 cells. (A) Huh7 cells were transfected as indicated or treated with rapamycin (200 nM) for 24 h. At 72 h posttransfection, cells were lysed, and the levels of LC3, HDAg, and β -actin were evaluated by Western blotting. (B) Huh7 cells were cotransfected with pClneo or pSVLD3 and peGFP-LC3. As a positive control for autophagy induction, Huh7 cells cotransfected with pClneo and peGFP-LC3 were treated with rapamycin (100 μ M) for 3 h. After 72 h, cells were fixed and then stained with anti-HDAg antibody from HDV⁺ human serum (red). The nucleus was stained with DAPI (blue). (C) The number of GFP-LC3 puncta per cell was calculated from confocal images (n = 100). (D) Huh7 cells were transfection, cells were lysed, and the levels of LC3, HDAg, and β -actin were evaluated by Western blotting. (E) Ratios of LC3/H/ β -actin.

able to enhance LC3II and autophagosome accumulation even in the absence of HBV envelope proteins. We then analyzed autophagy activity at two different time points (3 and 9 days posttransfection) to assess if LC3 lipidation was maintained during the entire replication cycle of HDV. As observed in Fig. 3D and E, the lipidation of LC3 was maintained during the course of HDV replication. It is worth noting that an enhanced lipidation of LC3I into LC3II can be observed at the time point of 9 days posttransfection, coinciding with a stronger production of HDAg. This finding suggests that although HBV can efficiently induce autophagosome accumulation, HDV has also evolved to trigger autophagosome formation.

The two isoforms of HDAg can induce autophagosome accumulation in Huh7 cells. HDV replication results in the expression of two isoforms of HDAg. S-HDAg

February 2020 Volume 94 Issue 4 e01936-19



FIG 4 The two isoforms of HDAg can induce autophagosome accumulation in Huh7 cells. (A) Huh7 cells were transfected with pClneo or a plasmid coding for L-HDAg (pClHD27) or S-HDAg (pClHD24). As a control, Huh7 cells were treated with rapamycin (200 nM) for 24 h. At 72 h posttransfection, cells were lysed, and the levels of LC3, HDAg, and β -actin were evaluated by Western blotting. (B) Ratios of LC3II/ β -actin. (C) Confocal images of Huh7 cells cotransfected with pClneo, pClHD27, pClHD24, and peGFP-LC3. The S-HDAg and L-HDAg proteins were labeled using anti-HDAg antibody from HDV⁺ human serum (red). The nucleus was stained with DAPI (blue). (D) The number of GFP-LC3 puncta per cell was calculated (n = 100).

(24 kDa) is expressed early upon infection. At a later stage, genome editing gives rise to L-HDAg (27 kDa) (20). To identify which of these two isoforms enhances LC3II formation, we transfected Huh7 cells with plasmids encoding either S-HDAg or L-HDAg (pCIHD24 and pCIHD27). Cells transfected with an empty plasmid or treated with rapamycin were used as negative and positive controls, respectively. Our results demonstrate that both S-HDAg and L-HDAg promote the accumulation of LC3II, suggesting that the effector domain is shared by the two isoforms of HDAg (Fig. 4A and B). To confirm the effect of HDAg isoforms on autophagosome formation, we analyzed GFP-LC3 punctum formation by confocal microscopy. Our findings show that S-HDAg and L-HDAg significantly increase the number of GFP-LC3 puncta per cell (Fig. 4C and D).

L-HDAg and S-HDAg expressions impede autophagic flux. As shown in Fig. 1A, we observed that the expression of HBV proteins was sufficient to increase the level of p62, suggesting a reduction of autophagic flux, as previously reported (10, 13, 26). Indeed, the degradation of p62 is widely used as a marker to monitor autophagic flux since its LIR (LC3-interacting region) motif allows its degradation within autolysosomes (30, 31). The increase in intracellular autophagosomes upon HDV protein expression may result from reduced autophagic flux. To test this hypothesis, Huh7 cells were transfected with pSVLD3 and/or pT7HB2.7, and the level of p62 was analyzed by Western blotting (Fig. 5A). Even in the absence of HBV envelope protein expression, HDV replication increases the intracellular level of p62. This suggests that HDV proteins can reduce autophagic flux without the need for virion formation. Rapamycin treatment, known to induce complete autophagic flux, was used as a control. To confirm that the accumulation of p62 was due to HDV protein expression, cells were transfected with a plasmid encoding L-HDAg or S-HDAg, and their effect on autophagy was analyzed by Western blotting. Interestingly enough, the results show that the two HDV

February 2020 Volume 94 Issue 4 e01936-19

Journal of Virology

Khabir et al.



FIG S L-HDAg and S-HDAg expressions impede autophagic flux. (A) Huh7 cells were transfected as indicated or transfected with pClneo and treated with rapamycin (200 nM) for 24 h. (Left) At 72 h posttransfection, the levels of p62, HDAg, and β -actin were evaluated by Western blotting. (Right) The ratios of p62/β-actin were quantified. (B) Huh7 cells were transfected with pClneo and treated or not with rapamycin (200 nM for 24 h) or with increasing quantities of pCHD27. (Left) After 72 h, the levels of expression of p62, LC3, L-HDAg, and β -actin were evaluated by Western blotting. (Right) The ratios of LC3II/ β -actin and p62/ β -actin were quantified. (C) Huh7 cells were transfected with pClneo or pCHD27 and treated or not with rapamycin and/or bafilomycin A1 (Baf), as indicated. (Left) After 72 h, cells were lysed, and the levels of p62, LC3, L-HDAg, and β -actin were evaluated by Western blotting. (Right) The ratios of LC3II/ β -actin and p62/ β -actin and p62/ β -actin were elavel at the levels of p62, LC3, L-HDAg, and β -actin were evaluated by Western blotting. (Right) The ratios of LC3II/ β -actin and p62/ β -actin were elavel at the levels of p62, LC3, L-HDAg, and β -actin were evaluated by Western blotting. (Right) The ratios of LC3II/ β -actin and p62/ β -actin were elavel at the levels of p62, LC3, L-HDAg, and β -actin were evaluated by Western blotting. (Right) The ratios of LC3II/ β -actin and p62/ β -actin were elavel at the levels of p62, LC3, L-HDAg, and β -actin were evaluated by Western blotting. (Right) The ratios of LC3II/ β -actin and p62/ β -actin were elavel at the levels of p62, LC3, L-HDAg, and β -actin were evaluated by Western blotting. (Right) The ratios of LC3II/ β -actin and p62/ β -actin were elavel at the level at

protein isoforms can efficiently block autophagic flux (Fig. 5A). To further explore whether the accumulation is a result of incomplete autophagic flux, a dose-response experiment was performed, in which the effect of increasing amounts of L-HDAg on the levels of LC3II and p62 was measured (Fig. 5B). For this experiment, pCIHD27 was selected over pCIHD24 due to the higher level of LC3II observed upon L-HDAg expression (Fig. 4B and D). As expected, the data show a clear L-HDAg dose-dependent accumulation of LC3II (Fig. 5B). It should be noted that the expression levels of L-HDAg and LC3II correlate with the amount of p62, strengthening our assumption that HDV proteins can negatively modulate a late step in autophagy.

To confirm the effect of L-HDAg expression on LC3II and p62 turnover, we treated Huh7 cells with rapamycin and/or bafilomycin A1. Treatment with bafilomycin A1 is

February 2020 Volume 94 Issue 4 e01936-19

known to abrogate autophagic flux completely through the inhibition of autolysosome acidification and autophagosome-lysosome fusion (32). It allows the direct comparison of protein turnover due to autophagic flux. Huh7 cells transfected with an empty plasmid (pClneo) and treated with rapamycin or bafilomycin A1 were used as controls (Fig. 5C). As expected, separate treatments with rapamycin and bafilomycin A1 in pClneo-transfected cells initiated a significant increase in the quantity of LC3II. However, only bafilomycin A1 treatment resulted in p62 accumulation. On the other hand, the expression of L-HDAg clearly induced the accumulation of LC3II and p62 regardless of drug treatments. Remarkably, the addition of bafilomycin A1 did not increase the level of p62. This means that L-HDAg was efficiently, or probably completely, blocking autophagic flux. These results confirm that HDV replication and its proteins promote the accumulation of autophagosomes and can effectively block the degradative action of autophagy.

The autophagy machinery promotes HDV replication. To understand whether the block of autophagy exerted by HDV was meant to allow viral replication, we sought to determine the effect of autophagy on the HDV life cycle. For this purpose, we produced Huh7 cells with a knockout of LC3, ATG5, or ATG7 using the same methodology as the one described above. The depletion of the targeted proteins was confirmed by Western blotting (Fig. 6A). Next, we analyzed the kinetics of HDV replication in wild-type Huh7 cells transfected with pT7HB2.7 and pSVLD3 and found that the peak of HDV particle production occurred at 9 to 12 days posttransfection (Fig. 6B). Therefore, day 9 posttransfection was chosen for the quantification of the intracellular replication and extracellular accumulation of the virus by reverse transcriptionguantitative PCR (RT-gPCR) in the different cell populations (mock, LC3-KO, ATG5-KO, and ATG7-KO). Surprisingly, and unlike HBV, the knockout of autophagy genes resulted in a clear reduction of viral genome replication, as shown by the decrease in intracellular RNA (Fig. 6C). HDV replication was mainly affected by ATG5 depletion and mildly affected by ATG7 and LC3 depletion. This suggests that the autophagy elongation complex rather than autophagosome maturation acts as a proviral factor at the replication step of HDV. Such an observation was previously made for hepatitis C virus (HCV) (17, 33). By analyzing the impact of gene knockouts on the complete replication cycle of the virus, no additional inhibition was observed in Huh7 ATG5-KO cells. This means that the primary proviral role of ATG5 is at a stage prior to viral morphogenesis (Fig. 6D). Interestingly, in LC3-KO cells, we observed a clear additional reduction in extracellular HDV particles. This suggests that LC3 likely participates in a step subsequent to genome replication (ribonucleoprotein [RNP] formation, envelopment, or secretion). These results are in sharp contrast with the role of autophagy in the HBV life cycle, where autophagy modulation had no effect on HBV genome replication but was important at a later stage (Fig. 2). Next, we sought to monitor the effect of autophagic protein knockouts on L-HDAg and S-HDAg expression. The results depicted in Fig. 6E demonstrate that the depletion of the autophagy proteins severely reduces viral protein expression, which is in agreement with the observed effect on HDV replication. On the whole, these results demonstrate that ATG5 is positively regulating HDV replication, whereas LC3 acts as a proviral factor mainly at a later replication step.

The autophagy machinery differentially affects the HBV and HDV replication cycle in cells expressing both viruses. In patients, HDV can produce infectious particles only in HBV-infected hepatocytes. Nevertheless, *in vitro* characterization of host factors affecting HDV replication in cells harboring HBV replication has been rarely performed. To characterize simultaneously the impact of the autophagy machinery on the HBV and HDV life cycle, we first analyzed the kinetics of expression of S-HDAg and L-HDAg in HepG2.2.15 cells transfected with pSVLD3 starting from day 3 to day 22 posttransfection (Fig. 7A). The appearance of L-HDAg is known to correspond to HDV RNP formation and envelopment (34). As expected, the levels of L-HDAg expression observed (days 8 to 11) perfectly correlated with the extracellular HDV RNA level (Fig. 7B). The results also show that HDV replication is transient in HepG2.2.15 cells and

February 2020 Volume 94 Issue 4 e01936-19

Journal of Virology

Khabir et al.



FIG 6 Autophagy machinery is required for HDV replication in Huh7 cells. (A) Huh7 cells were transduced with lentivirus to produce stable knockout populations for LC3, ATG5, and ATG7 genes. Western blotting was conducted to verify the knockout efficiencies. (B) Huh7 cells were cotransfected with pT7HB2.7 and pSVLD3 to produce HDV virions or with pSVLD3 and pClneo. The supernatants were harvested at different time points to determinate the kinetics of secretion of HDV virions by RT-qPCR. (C to E) Huh7 cells knocked out for LC3, ATG5, or ATG7 were cotransfected with pT7HB2.7 and pSVLD3. (C and D) At 9 days posttransfection, intracellular (C) and extracellular (D) HDV RNAs were quantified by RT-qPCR. To control DNA plasmid contamination, the supernatants were treated with Benzonase. Error bars show the standard errors of the means from three independent experiments, measured in triplicate. (E) Cell lysates were used for Western blotting to evaluate the LC3, HDAg, and *P*-actin expression levels.

mimics the replication cycle observed in Huh7 cells (Fig. 6B). Using a similar approach, we transfected HepG2.2.15 cells knocked out for LC3, ATG5, or ATG7 (Fig. 2) with pSVLD3 and analyzed viral replication and secretion at day 11 posttransfection. The results show that the replication of HDV did not modify the overall effect of autophagy

February 2020 Volume 94 Issue 4 e01936-19



FIG 7 Autophagy machinery differentially affects the HBV and HDV replication cycle in cells expressing both viruses. (A and B) The kinetics of HDV replication were evaluated in the presence of HBV replication. HepG2.2.15 cells were transfected with pSVLD3, and cells and supernatants were collected at different time points posttransfection. (A) Cell lysates from days 3 to 22 were subjected to Western blotting to evaluate the expression of HDAg and β -actin. (B) HDV RNAs from supernatants collected at 6 to 13 days posttransfection were quantified by RT-qPCR. To control for plasmid DNA contamination, the supernatants were treated with Benzonase, DNase treatment was carried out on columns during RNA extraction, and RT-qPCR was conducted with or without the reverse transcriptase enzyme. (C) HepG2.2.15 cells knocked out for LC3, ATG5, and ATG7 were transfected with pSVLD3. At 11 days posttransfection, cells and supernatants were harvested. (Left) To analyze intracellular HBV RNA, RT-qPCR was conducted. (Right) To measure the release of HBV virions, immunoprecipitated virions were subjected to qPCR. (D) Intracellular (left) and extracellular (right) HDV RNAs were quantified by RT-qPCR. Error bars show the standard errors of the means from three independent experiments, measured in triplicate.

proteins on the HBV replication cycle (Fig. 7C). Indeed, HBV genome replication remained unaffected by the knockout of autophagy proteins (Fig. 7C, left), whereas its maturation/secretion was still impaired (Fig. 7C, right). On the other hand, the knockout of ATG5 was detrimental for HDV genome replication (Fig. 7D, left), but no additional effect on its maturation was seen (Fig. 7D, right). Of note, the proviral effect of LC3 on HDV secretion detected in transfected Huh7 cells (Fig. 6D) was not observed in HepG2.2.15 cells. It is not clear whether this discrepancy is caused by cell tropism (Huh7 versus HepG2) or by the replication of both viruses in the same cells.

DISCUSSION

There is accumulating evidence that HBV has evolved to subvert autophagy in order to promote its replication cycle *in vitro* and *in vivo* (reviewed in reference 27). However,

February 2020 Volume 94 Issue 4 e01936-19

Khabir et al.

to our knowledge, this is the first study that explores the relationship between autophagy and HDV, an occasional and obligate satellite of HBV. Importantly, the overall effect of HDV on autophagy induction and the modulatory effect of autophagy on HDV replication were confirmed in a model that produces both viruses (HBV and HDV). Such studies are required to identify host factors that impede the concomitant replication of HBV and HDV. Although HBV standard-of-care treatments are efficient in reducing HBV replication and therefore reducing HBV-related cirrhosis and hepatocellular carcinoma, they are ineffective in controlling HDV-related pathogenesis. Several previous reports suggested that HBxAg protein activates autophagy under starvation conditions via different pathways (9, 10, 12). Conversely, a different group suggested that HBsAg protein is responsible for the induction of autophagy in HBV infection (14). In this research, we provide evidence that both HBxAg and HBsAg contribute to autophagosome accumulation in Huh7 cells under normal nutritive conditions. Our results similarly demonstrate that S-HDAg and L-HDAg induce autophagosome accumulation. The strong LC3II accumulation obtained upon S-HDAg or L-HDAg expression indicates that HDV has evolved to trigger early steps in autophagy. It can be argued that autophagy is already promoted by HBV, thus decreasing the biological relevance of this observation. However, since the HDV replication cycle depends on autophagy machinery, it seems important that HDV proteins maintain efficient activation in case HBV proteins fail to provide sufficient levels of induction. We also show that HDVinduced autophagosome accumulation seems to be mainly due to incomplete autophagic flux, as evidenced by p62 accumulation, which was comparable to the one observed upon bafilomycin A1 treatment. Blocking of autophagic flux has been observed with several viruses (15, 35, 36) and is believed to favor viral replication by impeding xenophagy and enriching the level of autophagy factors involved at diverse levels of viral replication. In the case of HBV, our results agree with those of a recent study showing that autophagy machinery (mainly the elongation complex, ATG5-12/ 16L1) is important for a late step in the HBV life cycle (11). Although our experimental design could not precisely identify the stage that requires the autophagy machinery, it is likely a stage that follows HBV transcription and translation as well as reverse transcription, since the depletion of LC3, ATG5, and ATG7 did not affect the intracellular levels of HBV RNA and DNA but significantly reduced Dane particle secretion. It is important to note that HBsAg secretion was slightly reduced in HepG2.2.15 cells depleted for LC3, ATG5, and ATG7. This suggests that the autophagy machinery supports HBV subviral particle secretion. However, the addition of rapamycin did not increase subviral particle secretion, which suggests that the inherent level of autophagy present in HepG2.2.15 cells is sufficient to assist subviral particle secretion. We speculate that the autophagy machinery increases viral particle secretion by providing an additional source of membranes at the viral particle formation site or that HBV triggers incomplete autophagic flux that enhances cell secretory pathways.

The main objective of this study was to identify the role of autophagy in the HDV life cycle. For this purpose, Huh7 and HepG2.2.15 cells knocked out for LC3, ATG5, and ATG7 were established using CRISPR-Cas9 technology. ATG5 and LC3 were chosen in order to dissect the independent contributions of the two autophagy conjugation systems (ATG5-12 and LC3II) to HDV propagation. Indeed, these conjugation systems form the main autophagy machinery required for double-membrane vesicle elongation and maturation (37-39). We also included ATG7 in our study since its enzymatic activity (E1-like activating enzyme) is essential for the conjugation of both ATG12 and LC3I (40). The deletion of ATG5 significantly reduced the intracellular HDV RNA level, indicating that ATG5 acts as a proviral factor. The deletion of ATG7 and LC3 rendered a milder effect on the pool of intracellular HDV RNA, suggesting that ATG5 per se is specifically important. Therefore, the implication of its conjugation to ATG12 for viral replication would need further characterization. Interestingly, we observed a severe depletion of the intracellular level of HDAg in cells knocked out for LC3, ATG5, and ATG7. The level of depletion observed for the HDV proteins, particularly obvious in ATG5-KO cells, is higher than the level of depletion observed for the HDV RNA. This discrepancy is likely

February 2020 Volume 94 Issue 4 e01936-19

Journal of Virology

due to the fact that our RT-qPCR cannot decipher between the different forms of HDV RNA (genomic, antigenomic, and mRNA). On the whole, these results imply that ATG5, rather than the entire autophagy process, assists viral replication in a noncanonical manner at a replication step prior to RNP formation. Importantly, the proviral effect of ATG5 on HDV and that of ATG5-12 on HBV were maintained in HepG2.2.15 cells producing HBV and HDV. Since HDV replication occurs in the nucleus, the specific nuclear relocalization of autophagy proteins, such as ATG5, ATG12, and ATG16L1, to assist in HDV replication should be explored. It is worth mentioning that two different phenotypes for HDV secretion were observed in LC3-KO Huh7 and HepG2.2.15 cells. In Huh7 cells, LC3 was found to have additional effects on the release of HDV particles, whereas in HepG2.2.15 cells, LC3 had no effect on HDV secretion. Probably, this discrepancy is caused by an intrinsic difference in the cell lines or linked to the presence of HBV replication in HepG2.2.15 cells. As such, the putative proviral effect of LC3 or its homologs on HDV requires further investigation.

In summary, we have identified ATG5 as an important host factor for the replication of HDV and also provide the first evidence that targeting autophagy represents an approach to target the life cycles of HBV and HDV simultaneously.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture, reagents, and antibodies. The human hepatocellular carcinoma cell line Huh7 and the human embryonic kidney cell line HEK293T were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. Concerning the production of HDV, Huh7 cells were cultured in Williams' medium E (WME) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 mg/ml gentamicin, and GlutaMAX (Gibco). The human hepatoblastoma cell lines HepG2 and HepG2.2.15 were cultured in WME supplemented with 10% FBS, 100 mg/ml gentamicin, and GlutaMAX. Rapamycin, bafilomycin A1, and Benzonase were purchased from Sigma-Aldrich. The concentration of rapamycin used in each experiment was adjusted depending on the exposure time to minimize toxicity. Protein A/G-agarose plus was purchased from Santa Cruz. DNase was purchased from Qiagen. Rabbit polyclonal anti-LC3B (catalog number L7543) and anti-ATG5 (catalog number A0856) antibodies and mouse monoclonal anti- β -actin (catalog number A5441) and anti-Flag (catalog number F1804) (for immunofluorescence) antibodies were purchased from Sigma-Aldrich. The monoclonal antibody anti-SQSTM1 (catalog number H00008878) was purchased from Abnova. The rabbit polyclonal antibodies anti-ATG7 (catalog number D12B11) and anti-Flag (catalog number 2368) (for Western blotting) were purchased from Cell Signaling. Human serum against HDV was described previously (41). The anti-preS1 (catalog number Sc-57761) monoclonal antibody was purchased from Santa Cruz.

Plasmids and transfection. The HBV recombinant plasmid pCIHBenv(-) was used for the production of HBV nucleocapsid, and the plasmid pCIHBenv(+) was used for the production of HBV virions, as previously described (42). The HBV expression vector pT7HB2.7 was used for the production of L-HBsAg, medium HBsAg (M-HBsAg), S-HBsAg, and HBxAg proteins under the control of the endogenous HBV promoters (42-44). The plasmid pT7HB2.7x(-) is derived from the pT7HB2.7 plasmid, where the start codon of HBxAg was mutated from AUG to GUG using the QuikChange lightning site-directed mutagenesis kit (Agilent). For the construction of pCIHBx-Flag and pCIHBs-Flag, the sequences coding for S-HBsAg and HBxAg were amplified by PCR from the pCIHBenv(+) plasmid and then inserted between the Notl and Nhel restriction sites in the pCIneo plasmid (Promega). In parallel, a Flag tag was added to the C terminus of each protein. The primers used for S-HBsAg and HBxAg cloning are 5'-GGGAAGCGGCCGC TTAAATGTATACCCA-3' and 5'-TATAGGCTAGCACCATGGAGAACATCACATCAG-3', and 5'-AGGGAAGCGG CCGCTTAGGCAGAGGTGAA-3' and 5'-TATAGGCTAGCACCATGGCTGCTAGGCTG-3', respectively. The addition of the Flag tag to S-HBsAg and HBxAg was performed using the following primers: 5'-GGGAAGCG GCCGCTTACTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTCAATGTATACCCAAAG-3' and 5'-AGGGAAGCGGCCGCTTACTTG TCGTCATCGTCTTTGTAGTCGGCAGAGGGGAAA-3'. The plasmid pSVLD3, containing three head-to-tail copies of the full-length HDV cDNA, was used for the replication of HDV RNA and the production of HDV RNP (24, 45, 46). The plasmids pCIHD24 and pCIHD27 were used for the expression of S-HDAg and L-HDAg, respectively (24). The peGFP-LC3 plasmid was kindly provided by Tamotsu Yoshimori. Transfection with plasmid DNA was carried out using Lipofectamine 2000 (Life Technologies). The quantities of DNA plasmids are indicated in the figure legends; otherwise, a quantity of 1.6 μ g DNA plasmid was used for cells in 12-well plates. The efficiency of transfection was evaluated using the peGFP plasmid and visualized by immunofluorescence microscopy.

CRISPR-Cas9 knockouts. Lentiviral constructs were used as vectors for the expression of Cas9 and small guide RNA (sgRNA). The lentiCRISPRv2, psPAX2, pMD2.G, and pRSV-REV plasmids were purchased from Addgene. Target sequences for the specific knockout of LC3B, ATG5, and ATG7 were identified using the E-CRISP online tool (http://www.e-crisp.org/), along with basic settings (Table 1), and cloned into the lentiCRISPRv2 plasmid. Lentiviral vectors were produced by the transfection of HEK293T cells with lentiCRISPRv2 derivatives, along with packaging plasmids psPAX2, pMD2.G, and pSV-REV. The supernatants from these transfected cells were collected at day 2 posttransfection, clarified, and filtered (0.45 μ m). Target cells (Huh7 or HepG2.2.15) were inoculated with the lentiviral

February 2020 Volume 94 Issue 4 e01936-19

Journal of Virology

Journal of Virology

Khabir et al.

TABLE 1 Guide RNA primer sequences used in this study

Gene	Guide RNA primer sequence
LC3B	Forward, CACCGGTGATAATAGAACGATACAA Reverse, AAACTTGTATCGTTCTATTATCACC
ATG5	Forward, CACCGGATCACAAGCAACTCTGGAT Reverse, AAACATCCAGAGTTGCTTGTGATCC
ATG7	Forward, CACCGGTATGATGAGAACATGGTGC Reverse, AAACGCACCATGTTCTCATCATACC

constructs for 16 h in the presence of 8 μ g/ml Polybrene (Sigma) and further cultured for 9 days in the presence of 1 μ g/ml puromycin (Sigma). As controls, mock cells were transduced with lentiviral vectors containing no sgRNA sequence but still driving the expression of Cas9. Cells were then harvested, lysed, and analyzed by Western blotting.

Quantitative PCR. (i) HDV. The supernatant was clarified by centrifugation at 1,200 rpm for 10 min prior to Benzonase treatment (30 min at 37°C). HDV RNA was extracted using a QlAamp viral RNA minikit (Qiagen) and reverse transcribed using iScript select cDNA (Bio-Rad). Quantification of HDV RNA was then conducted by TaqMan PCR. Intracellular HDV RNA was extracted using an Aurum total RNA minikit (Bio-Rad). The sequences for forward and reverse primers and the probe were 5'-TGGACGTGCGCCTCC CT-3', 5'-TCTTCGGGCGGCGCGCATGG-3', and 5'-ATGCCCAGGTCGGCAC-3' (5'-6-carboxyfluorescein [FAM]/3'-6-carboxytetramethylrhodamine [TAMRA]), respectively, as previously described (41).

(ii) HBV. The supernatant was clarified by centrifugation at 1,200 rpm for 10 min prior to Benzonase treatment (30 min at 37°C). The treated supernatants containing Dane particles were subjected to immunoprecipitation using protein A/G-agarose plus beads and anti-pre51 antibody. Intracellular and extracellular HBV DNAs were extracted using a QlAamp viral DNA minikit (Qiagen). Intracellular HBV RNA was extracted using an Aurum total RNA minikit (Bio-Rad). The cDNA was obtained using iscript select cDNA (Bio-Rad). Quantification of HBV DNA and RNA was performed by TaqMan real-time PCR. The sequences for the forward and reverse primers and the probe were 5'-ACGTCCTTGTTACGTC CCG-3', 5'-CCAACTCCTCCCAGTCTTTAAAC-3', and 5'-FAM-TCAACGACCGACCTTGA-dabcyl-MBG-3', respectively.

Indirect immunofluorescence and confocal microscopy. For the detection of autophagosomes, Huh7 cells were cotransfected with peGFP-LC3 and plasmids as indicated in the figure legends. The fluorescence of GFP-LC3 was observed by confocal microscopy. Cells containing three or more GFP-LC3 dots were defined as autophagy-positive cells. The number of GFP-LC3 puncta per cell was calculated from 100 GFP-positive cells per sample unless otherwise indicated in the figure legends. For protein staining, Huh7 cells were cotransfected with the different plasmids as indicated in the figure legends. Forty-eight hours later, cells were trypsinized and grown on glass coverslips. After 24 h, cells were fixed using 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 10 min and permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 5 min. Next, coverslips were incubated with a blocking solution (PBS, 3% bovine serum albumin [BSA], 10% FBS) for 30 min at room temperature (RT), rinsed with PBS, and then incubated with the corresponding primary antibody (anti-HDAg antibody from HDV-positive [HDV+] human serum at a 1:1,000 dilution or mouse anti-Flag at 1:100) for 1 h at room temperature. After incubation, cells were rinsed with PBS and incubated with the corresponding secondary antibody (goat anti-human or anti-mouse Alexa Fluor 568 antibody) for 1 h at room temperature. After incubation, cells were rinsed with PBS and incubated with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; Life Technologies) to stain cell nuclei. The coverslips were mounted on glass slides with Prolong Diamond antifade (Invitrogen) and analyzed using a Zeiss LSM 780 confocal microscope.

Western blotting. Cells were lysed in lysis buffer (25 mM Tris-HCI [pH 7.4], 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM EDTA, 5% glycerol) supplemented with an EDTA-free complete protease inhibitor (Roche). A Pierce bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Thermo Scientific) was used to normalize for total protein content in the different lysates. Equivalent amounts of protein were subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Bio-Rad). The membranes were blocked for 30 min at room temperature with PBS-5% milk and then incubated overnight at 4°C with primary antibodies in PBS-0.1% BSA. Membranes were then washed with 0.4% Tween 20 in PBS and incubated for 1 h at RT with a horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (goat anti-rabbit, goat anti-mouse, or goat anti-human IgG) in PBS-5% milk. Protein bands were revealed using the Clarity Western ECL reagent (Bio-Rad) using a ChemiDoc MP imaging system (Bio-Rad).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). HBsAg quantification in supernatants of cultured cells was carried out using the Murex HBsAg Version 3 kit (DiaSorin) as previously described (47).

Statistics. To statically analyze the results, a two-tailed, unpaired t test was performed using GraphPad Prism 5. *P* values below 0.05 were considered statistically significant (*, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01; ***, *P* < 0.001). The values are expressed as the means \pm the standard errors of the means from at least three independent experiments.

February 2020 Volume 94 Issue 4 e01936-19

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ahmed Fahmy for helpful comments on the manuscript and Tania Lucette Lognon Bomombé, and Jessy Trembley for technical support. We thank Ridha Bouich for proofreading the manuscript. The peGFP-LC3 construct was kindly supplied by Tamotsu Yoshimori. lentiCRISPRv2 puro was a gift from Brett Stringer (Addgene plasmid 98290). pRSV-Rev, psPAX2, and pMD2.G were gifts from Didier Trono (Addgene plasmids 12253, 12260, and 12259).

This work was supported by a grant from the NSERC of Canada to P.L. M.K. was supported by a scholarship from the Tunisian Ministry of Education.

REFERENCES

- Klionsky DJ, Emr SD. 2000. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. Science 290:1717–1721. https://doi.org/10.1126/science.290 .5497.1717.
- 2. Noda NN, Inagaki F. 2015. Mechanisms of autophagy. Annu Rev Biophys 44:101–122. https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-060414-034248.
- Shpilka T, Mizushima N, Elazar Z. 2012. Ubiquitin-like proteins and autophagy at a glance. J Cell Sci 125:2343–2348. https://doi.org/10.1242/ jcs.093757.
- Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, Natsume T, Ohsumi Y, Yoshimori T. 2003. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. J Cell Sci 116:1679–1688. https://doi.org/10 .1242/jcs.00381.
- Sakoh-Nakatogawa M, Matoba K, Asai E, Kirisako H, Ishii J, Noda NN, Inagaki F, Nakatogawa H, Ohsumi Y. 2013. Atg12-Atg5 conjugate enhances E2 activity of Atg3 by rearranging its catalytic site. Nat Struct Mol Biol 20:433–439. https://doi.org/10.1038/nsmb.2527.
- Hanada T, Noda NN, Satomi Y, Ichimura Y, Fujioka Y, Takao T, Inagaki F, Ohsumi Y. 2007. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. J Biol Chem 282:37298–37302. https://doi.org/10.1074/jbc.C700195200.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. EMBO J 19:5720–5728. https://doi.org/10.1093/emboj/19.21 .5720.
- Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. 2011. The role of Atg proteins in autophagosome formation. Annu Rev Cell Dev Biol 27:107–132. https:// doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154005.
- Wang P, Guo QS, Wang ZW, Qian HX. 2013. HBx induces HepG-2 cells autophagy through PI3K/Akt-mTOR pathway. Mol Cell Biochem 372: 161–168. https://doi.org/10.1007/s11010-012-1457-x.
- Zhong L, Shu W, Dai W, Gao B, Xiong S. 2017. Reactive oxygen speciesmediated c-Jun NH2-terminal kinase activation contributes to hepatitis B virus X protein-induced autophagy via regulation of the Beclin-1/Bcl-2 interaction. J Virol 91:e00001-17. https://doi.org/10.1128/JVI.00001-17.
- Doring T, Zeyen L, Bartusch C, Prange R. 2018. Hepatitis B virus subverts the autophagy elongation complex Atg5-12/16L1 and does not require Atg8/LC3 lipidation for viral maturation. J Virol 92:e01513-17. https://doi .org/10.1128/JVI.01513-17.
- Tang H, Da L, Mao Y, Li Y, Li D, Xu Z, Li F, Wang Y, Tiollais P, Li T, Zhao M. 2009. Hepatitis B virus X protein sensitizes cells to starvation-induced autophagy via up-regulation of beclin 1 expression. Hepatology 49: 60–71. https://doi.org/10.1002/hep.22581.
- Liu B, Fang M, Hu Y, Huang B, Li N, Chang C, Huang R, Xu X, Yang Z, Chen Z, Liu W. 2014. Hepatitis B virus X protein inhibits autophagic degradation by impairing lysosomal maturation. Autophagy 10:416–430. https://doi.org/10.4161/auto.27286.
- Li J, Liu Y, Wang Z, Liu K, Wang Y, Liu J, Ding H, Yuan Z. 2011. Subversion of cellular autophagy machinery by hepatitis B virus for viral envelopment. J Virol 85:6319–6333. https://doi.org/10.1128/JVI.02627-10.
- Choi Y, Bowman JW, Jung JU. 2018. Autophagy during viral infection—a double-edged sword. Nat Rev Microbiol 16:341–354. https://doi.org/10 .1038/s41579-018-0003-6.
- Jackson WT, Giddings TH, Jr, Taylor MP, Mulinyawe S, Rabinovitch M, Kopito RR, Kirkegaard K. 2005. Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. PLoS Biol 3:e156. https://doi.org/10.1371/ journal.pbio.0030156.

February 2020 Volume 94 Issue 4 e01936-19

- Fahmy AM, Labonte P. 2017. The autophagy elongation complex (ATG5-12/16L1) positively regulates HCV replication and is required for wildtype membranous web formation. Sci Rep 7:40351. https://doi.org/10 .1038/srep40351.
- Wedemeyer H, Hardtke S, Manns MP. 2013. Treatment of hepatitis delta. Clin Liver Dis (Hoboken) 2:237–239. https://doi.org/10.1002/cld.254.
- Chao M, Hsieh SY, Taylor J. 1990. Role of two forms of hepatitis delta virus antigen: evidence for a mechanism of self-limiting genome replication. J Virol 64:5066–5069.
- Casey JL. 2012. Control of ADAR1 editing of hepatitis delta virus RNAs. Curr Top Microbiol Immunol 353:123–143. https://doi.org/10.1007/82 _2011_146.
- Glenn JS, Watson JA, Havel CM, White JM. 1992. Identification of a prenylation site in delta virus large antigen. Science 256:1331–1333. https://doi.org/10.1126/science.1598578.
- Lee CH, Chang SC, Wu CH, Chang MF. 2001. A novel chromosome region maintenance 1-independent nuclear export signal of the large form of hepatitis delta antigen that is required for the viral assembly. J Biol Chem 276:8142–8148. https://doi.org/10.1074/jbc.M004477200.
- Chang FL, Chen PJ, Tu SJ, Wang CJ, Chen DS. 1991. The large form of hepatitis delta antigen is crucial for assembly of hepatitis delta virus. Proc Natl Acad Sci U S A 88:8490–8494. https://doi.org/10.1073/pnas.88 .19.8490.
- Komla-Soukha I, Sureau C. 2006. A tryptophan-rich motif in the carboxyl terminus of the small envelope protein of hepatitis B virus is central to the assembly of hepatitis delta virus particles. J Virol 80:4648–4655. https://doi.org/10.1128/JVI.80.10.4648-4655.2006.
- Ryu WS, Bayer M, Taylor J. 1992. Assembly of hepatitis delta virus particles. J Virol 66:2310–2315.
- Sir D, Tian Y, Chen WL, Ann DK, Yen TS, Ou JH. 2010. The early autophagic pathway is activated by hepatitis B virus and required for viral DNA replication. Proc Natl Acad Sci U S A 107:4383–4388. https:// doi.org/10.1073/pnas.0911373107.
- Xie M, Yang Z, Liu Y, Zheng M. 2018. The role of HBV-induced autophagy in HBV replication and HBV related-HCC. Life Sci 205:107–112. https:// doi.org/10.1016/j.lfs.2018.04.051.
- Sells MA, Chen ML, Acs G. 1987. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 84:1005–1009. https://doi.org/10.1073/pnas.84.4.1005.
- Chen PJ, Kalpana G, Goldberg J, Mason W, Werner B, Gerin J, Taylor J. 1986. Structure and replication of the genome of the hepatitis delta virus. Proc Natl Acad Sci U S A 83:8774–8778. https://doi.org/10.1073/ pnas.83.22.8774.
- Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Overvatn A, Bjorkoy G, Johansen T. 2007. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. J Biol Chem 282:24131–24145. https://doi.org/10.1074/jbc .M702824200.
- Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H, Johansen T. 2005. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtininduced cell death. J Cell Biol 171:603–614. https://doi.org/10.1083/jcb .200507002.
- Mauvezin C, Neufeld TP. 2015. Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/ SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion. Autophagy 11: 1437–1438. https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1066957.
- 33. Fahmy AM, Khabir M, Blanchet M, Labonte P. 2018. LC3B is not recruited

Khabir et al.

along with the autophagy elongation complex (ATG5-12/16L1) at HCV replication site and is dispensable for viral replication. PLoS One 13: e0205189. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205189.

- Lee CZ, Chen PJ, Chen DS. 1995. Large hepatitis delta antigen in packaging and replication inhibition: role of the carboxyl-terminal 19 amino acids and amino-terminal sequences. J Virol 69:5332–5336.
- Wang Y, Jiang K, Zhang Q, Meng S, Ding C. 2018. Autophagy in negativestrand RNA virus infection. Front Microbiol 9:206. https://doi.org/10 .3389/fmicb.2018.00206.
- Granato M, Santarelli R, Farina A, Gonnella R, Lotti LV, Faggioni A, Cirone M. 2014. Epstein-Barr virus blocks the autophagic flux and appropriates the autophagic machinery to enhance viral replication. J Virol 88: 12715–12726. https://doi.org/10.1128/JVI.02199-14.
- Romanov J, Walczak M, Ibiricu I, Schuchner S, Ogris E, Kraft C, Martens S. 2012. Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. EMBO J 31: 4304–4317. https://doi.org/10.1038/emboj.2012.278.
- Walczak M, Martens S. 2013. Dissecting the role of the Atg12-Atg5-Atg16 complex during autophagosome formation. Autophagy 9:424–425. https://doi.org/10.4161/auto.22931.
- Tanida I, Ueno T, Kominami E. 2004. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. Int J Biochem Cell Biol 36:2503–2518. https://doi.org/ 10.1016/j.biocel.2004.05.009.
- 40. Ohsumi Y, Mizushima N. 2004. Two ubiquitin-like conjugation systems

essential for autophagy. Semin Cell Dev Biol 15:231–236. https://doi.org/ 10.1016/i.semcdb.2003.12.004.

- Beilstein F, Blanchet M, Vaillant A, Sureau C. 2018. Nucleic acid polymers are active against hepatitis delta virus infection in vitro. J Virol 92:e01416-17. https://doi.org/10.1128/JVI.01416-17.
- Blanchet M, Sureau C. 2006. Analysis of the cytosolic domains of the hepatitis B virus envelope proteins for their function in viral particle assembly and infectivity. J Virol 80:11935–11945. https://doi.org/10 .1128/JVI.00621-06.
- Sureau C, Guerra B, Lee H. 1994. The middle hepatitis B virus envelope protein is not necessary for infectivity of hepatitis delta virus. J Virol 68:4063–4066.
- 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:e00272-18. https://doi.org/10.1128/JVI.00272-18.
- Kuo MY, Chao M, Taylor J. 1989. Initiation of replication of the human hepatitis delta virus genome from cloned DNA: role of delta antigen. J Virol 63:1945–1950.
- Sureau C, Taylor J, Chao M, Eichberg JW, Lanford RE. 1989. Cloned hepatitis delta virus cDNA is infectious in the chimpanzee. J Virol 63: 4292–4297.
- Blanchet M, Sinnathamby V, Vaillant A, Labonte P. 2019. Inhibition of HBsAg secretion by nucleic acid polymers in HepG2.2.15 cells. Antiviral Res 164:97–105. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.02.009.

February 2020 Volume 94 Issue 4 e01936-19

CHAPITRE 3: DEUXIÈME PUBLICATION

Exosomes mediate HDV transmission between hepatocytes

Khabir M^a, Blanchet M^{a c}, Sureau C^b, Bukong TN^a, Labonté P^a. (2020) En préparation.

INRS – Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Laval, Canada

^bInstitut National de la Transfusion Sanguine, Paris, France

^cReplicor.inc, Montréal, Canada

Résumé

Les vésicules extracellulaires sont un moyen pour communication intercellulaires. Elles contiennent des protéines, des lipides et de l'acide nucléique qui peuvent être transmis aux cellules adjacentes et distantes. À cet égard, différents types de vésicules extracellulaires ont été décrits, y compris des exosomes. Récemment, plusieurs études ont émergé pour démontrer le rôle important des exosomes dans la transmission des composants viraux, y compris ceux du virus de l'hépatite B, entre les cellules. En tant que virus défectueux, satellite occasionnel du VHB, le virus de l'hépatite delta (VHD) a besoin des protéines d'enveloppe du VHB pour compléter son cycle de réplication. Cependant, le VHD est capable de répliquer son génome dans les hépatocytes indépendamment du VHB. Dans cette étude, la transmission indépendante du VHB du génome du VHD et des protéines virales, à savoir S-AgHD et L-AgHD, a été démontrée. De plus, l'expression de l'AgHD augmente considérablement la sécrétion d'exosomes. Fait intéressant, l'AgHD et le génome du VHD ont été enrichis dans les exosomes purifiés à partir de cellules Huh7 exprimant le VHD. Nos résultats mettent en évidence le rôle des exosomes dans la transmission d'éléments viraux du VHD indépendante du VHB entre les hépatocytes *in vitro*.
Contribution des auteurs

Marwa Khabir: Conception et réalisation des manipulations, préparation des figures, rédaction et révision du manuscrit.

Matthieu Blanchet: Conception des expériences, révision du manuscrit

Camille Sureau: Révision du manuscrit

Terence Ndonyi Bukong: Révision du manuscrit

Patrick Labonté: Conception des expériences, préparation des figures et révision du manuscrit

Exosomes mediate HDV transmission between hepatocytes

Marwa Khabir^a, Matthieu Blanchet^{a c}, Camille Sureau^b, Terence Ndonyi Bukong^a and Patrick Labonté^{*a}

^a INRS – Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Laval, Canada.

^b Institut National de la Transfusion Sanguine, Paris, France.

^c Replicor.inc, Montréal, Canada

*Corresponding author.

KEYWORDS: hepatitis delta virus (HDV), exosomes, HBV-independent transmission

ABSTRACT

Extracellular vesicles are a means for intercellular communications. They harbor proteins, lipids, and nucleic acid that can be transmitted to adjacent and long-range cells. In this regard, different types of extracellular vesicles have been described, including exosomes. Recently, several studies have emerged demonstrating the important role of exosomes in the transmission of viral components, including those of the Hepatitis B virus between cells. As a defective virus and occasional satellite of HBV, the hepatitis delta virus (HDV) requires the HBV envelope proteins to complete its life cycle. However, HDV is able to replicate its genome in hepatocytes independently of HBV. In this study, HBV-independent transmission of the HDV genome and of the proteins it encodes, namely S-HDAg and L-HDAg was demonstrated. Furthermore, expression of HDAg significantly enhances exosome secretion. Interestingly, HDAg and HDV genome were enriched in purified exosomes from Huh7 cells expressing HDV. Our results highlight the role of exosomes in HBV-independent transmission of HDA viral components between hepatocytes *in vitro*.

IMPORTANCE

Exosomes mediate intercellular communication. Recently, there has been a growing interest in the function of exosomes during viral infection. For instance, it has been demonstrated that exosomes can mediate paracrine transmission of hepatitis B virus. However, the transmission of HDV, a satellite virus of HBV, between cells through exosomes has not been examined. In the absence of therapeutic treatment against HDV, an understanding of the HDV transmission via exosomes should prove beneficial to the development of new therapeutic strategies.

INTRODUCTION

Exosomes are nano-sized extracellular vesicles (50 nm to 150 nm) that are secreted by most cells (Hessvik & Llorente, 2018; Mathieu et al., 2019; Thery et al., 2002b). Exosomes originate from the endosomal pathway and correspond to the intraluminal vesicles forming the multivesicular body (MBV) (Zhang et al., 2019). Originally, it was thought that exosomes were the waste products released via shedding of the plasma membrane (Edgar, 2016). Recently, several key roles of exosomes were demonstrated, i) cellular homeostasis (Hessvik & Llorente, 2018), ii) inflammation (Chan et al., 2019), and iii) antigen presentation (Zhang et al., 2018). Consequently, cell-to-cell communication is ensured, at least in part, by secreted exosomes. Hence, exosomes mediate the transfer of bio-macromolecules, functional proteins and nucleic acids between cells (Zhang et al., 2019). Some proteins such as TSG101 (an ESCRT-I component) and tetraspanins (CD81, CD9) are enriched in exosomes, and are therefore commonly used as markers to characterize exosomes (Mathivanan et al., 2010; Mathivanan & Simpson, 2009; Record et al., 2014). The contents of exosomes can be transferred to recipient cells and influence their functions (Thery et al., 2002b; Valadi et al., 2007). It has been demonstrated that exosomes contain proteins, lipids and a variety of nucleic acids (double-stranded DNA, mRNAs, microRNAs, and long noncoding RNAs). This emphasizes the role of exosomes in cell-to-cell communication and intercellular transfer, not only of proteins, but also of genetic information (Schorey et al., 2015). In addition to host components, exosomes can harbor pathogen-derived elements. For example, it has been shown that exosomes isolated from HCV-infected patients' sera contain HCV RNA and that receptorindependent transmission of HCV could be mediated by exosomes (Bukong *et al.*, 2014; Urbanelli *et al.*, 2019).

Exosomes have also been shown to participate in HBV replication and to modulate the immune response during HBV infection (Li et al., 2019). Indeed, it has been shown that exosomes isolated from Hepatitis B virus-infected patients' sera contained HBV viral components and caused an active infection in naïve human hepatocytes (Yang et al., 2017c). Similarly, it has been reported that exosomes can harbor HBV proteins (HBxAq, HBsAg, HBcAg, and polymerase) [reviewed in (Li et al., 2019)]. When carrying different HBV components, exosomes enhance the transmission of HBV infection to uninfected cells and influence the physiological activities of surrounding cells (Kapoor et al., 2017; Yang et al., 2017c). It has been demonstrated that exosomes can mediate HBV transmission into NK cells (Yang et al., 2017c). HBV rcDNA, HBV RNA and HBsAg proteins were detected in NK cells that were exposed to HBV-positive exosomes (Yang et al., 2017c). Interestingly, the functions of NK cells were altered in the presence of exosomes derived from sera of chronically infected HBV patients. This suggests that exosomes may be involved in the escape from innate immunity by HBV (Yang et al., 2017c). Furthermore, HBV increases the expression level of different immunoregulatory miRNAs within extracellular vesicles, including exosomes like miR-21 and miR-29 (Kouwaki et al., 2016). Extracellular vesicles including exosomes mediate the transfer of these miRNAs from hepatocytes expressing HBV to macrophages (Kouwaki et al., 2016). These exosomal miRNAs downregulate the expression of IL-12 and may inhibit NK cells which could help the virus to escape from the innate immune response (Kouwaki et al., 2016). Further, cellular protein content in exosomes was shown to change significantly

following HBV replication (Jia *et al.*, 2017). Exosomes from HBV replicating cells can carry five subunit proteins from the 26S proteasome complex. The incubation of these exosomes with monocytes significantly reduces the level of IL6 that may enhance HBV persistence (Jia *et al.*, 2017). Additionally, it has been reported that exosomes can mediate the transmission of IFN- α -induced antiviral responses from nonparenchymal liver cells to HBV-infected hepatocytes promoting an antiviral state in hepatocytes (Li *et al.*, 2013). Furthermore, exosomes isolated from HepG2.2.15 cells expressing HBV were also found to contain viral microRNAs (miR) like HBV-miR-3 which repress HBV replication (Yang *et al.*, 2017b).

HDV is a defective virus. It needs its helper virus, the Hepatitis B virus, to form mature infectious virions (Wedemeyer *et al.*, 2013). The HDV genome is a negative-strand RNA that contains one ORF which encodes for HDAg. This protein is expressed as two isoforms. The first isoform, the 24 KDa small-HDAg (S-HDAg) is expressed early in the infection process and is important for the replication of the viral genome (Mei Chao *et al.*, 1990). At a later stage of the infection, the edition of the amber stop codon of the S-HDAg to a tryptophane by the host double-stranded RNA adenosine deaminase (ADAR1) results in the addition of 19 amino acid and allows the expression of the large isoform (27 KDa) of the protein (L-HDAg) (Casey, 2012). L-HDAg is characterized by the presence of a nuclear export signal (NES) and of a CXXX motif within the 19 amino acid extension allowing its nuclear export and prenylation, respectively (Glenn *et al.*, 1992b; Lee *et al.*, 2001). These signals are important for the formation and the secretion of infectious viral particles (Chang *et al.*, 1991). Since they share a similar envelope, HBV and HDV use the same receptors to enter hepatocytes (Sureau & Negro, 2016). Indeed, they both

depend on the specific interaction of the preS1 domain of L-HBsAg with the sodium taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP), a multiple transmembrane transporter, expressed mainly in the liver (Huan Yan et al., 2012). HDV assembly relies on the specific interaction between the prenylated N-terminus of L-HDAg and the S region of HBsAg (Chang et al., 1991; Komla-Soukha & Sureau, 2006; Ryu et al., 1992). Moreover, it has been shown that the morphogenesis of HDV is dependent on clathrin heavy chain (CHC) and that L-HDAq, S-HBsAq, and CHC were found to colocalize with the trans-Golgi network and were highly enriched in clathrin-coated vesicles (Huang et al., 2009; Wang et al., 2009). Recently it has been demonstrated that HDV could use other helper enveloped virus, distinct from HBV, like HCV or Dengue virus to egress from hepatocytes (Perez-Vargas et al., 2019) suggesting that HDV could use unconventional cell transmission strategies and could be associated with different envelope glycoproteins. Besides, a recent study has shown that extracellular vesicles harbor HDV RNA (Jung et al., 2020). Also several publications have shown that viruses like the human immunodeficiency virus (HIV), hepatitis C virus (HCV) and HBV, can be transmitted in a receptor-independent manner, via extracellular vesicles including exosomes (Urbanelli et al., 2019; Yang et al., 2017c).

In this study, we observed that HDV components can be propagated to naïve hepatocytes *in vitro* in absence of HBV. In addition, we found that exosomes isolated from supernatant of cells expressing HDV contain the two isoforms of HDAg, along with viral HDV RNA. We therefore suggest that HDV can be transmitted between cells through the exosomes.

RESULTS

HBV-independent spreading of S-HDAg and L-HDAg in vitro

Although HDV is a defective virus, it can replicate its genome independently of HBV (Mentha et al., 2019). The replication of HDV RNA results in the production of two isoforms of HDAg (S-HDAg and L-HDAg). Huh7 cells are not transfected efficiently therefore a significant number of cells remain naïve after the transfection process. Here, surprisingly, we observed that a significant proportion of Huh7 naïve cells expressed only the L-HDAg (Fig. 1B). This means that the co-transfected Huh7 cells with plasmids encoding for the GFP (peGFP) and L-HDAg (pCIHD27) could transfer the L-HDAg to the naïve cells. This was a first indication that L-HDAg (but not the GFP) could spread independently of a full viral structure. The same observation was made in Huh7 cells cotransfected with plasmids coding the GFP and the S-HDAg (pCIHD24) (Fig. 2B). It can also be noted that the propagation of S-HDAg and L-HDAg to the surrounding cells increases over time (Fig.1B and 2B). As we can observe in Fig. 1B, we detect the L-HDAg in surrounding cells starting at 24 h post co-transfection and the propagation of L-HDAg is intensified at 48 h and at 72 h. Consequently, for the Fig.2B we chose to evaluate the propagation of S-HDAg at 24 h and 72 h. The observed propagation of the HDAg was not due to unspecific background since no staining against HDAg occurred in the negative control, in which Huh7 cells were co-transfected with peGFP and pCIneo. To verify that this observation is biologically significant and not due to a technical artifact, we transfected the Huh7 cells separately either with peGFP, pmRuby2, pSVLD3, pCIHD24 or pCIHD27 plasmids. We then co-cultured the different transfected cells with GFPexpressing cells for 72 h and analyzed protein expression by FACS and confocal microscopy (Fig. 3A and Fig.4A). Our hypothesis was that HDAg produced by cells transfected with pSVLD3, pCIHD24 or pCIHD27 plasmids would spread to GFP positive Huh7 cells and give rise to a double-positive population (GFP+, HDAg+). GFP-transfected cells co-cultured with pmRuby2-transfected cells were used as negative control. The results depicted in Fig. 3B clearly show that HDAg from pSVLD3 transfected cells and pCIHD24 transfected cells can significantly propagate to the GFP-transfected cells compared to the negative control (peGFP+pmRuby2). However, the propagation of L-HDAg was less pronounced in this experiment. The percentage of double positive cells detected upon the co-culture of GFP-transfected cells with pmRuby2-transfected cells (negative control) is low which indicates that the ability of propagation is specific to HDAg. These results demonstrate that HDAg can propagate in absence of HBV envelope proteins and HDV virions. Interestingly, the proportion of double-positive cells was significantly higher upon pSVLD3 transfection when compared to pCIHD24 and pCIHD27 transfection. This was somehow surprising since the expression level from pCIHD24 and pCIHD27 is from a CMV promoter that gives rise to higher expression compared to pSVLD3 expression as observed by western blotting (Fig. 3C). From this result, we speculated that in pSVLD3 transfected cells, replication of the HDV genome occurs along with the synthesis of the HDAg isoforms. The elements assembled into a ribonucleoprotein structure. We hypothesize from our results that this structure promotes the spreading of HDV components in a more efficient manner than S- or L-HDAg alone. Furthermore, the S-HDAg isoform was more efficient to propagate than the L-HDAg even though their expression level were similar (Fig. 3C). The results of confocal microscopy, using the same experimental setting, also showed the apparition of double-positive cells

expressing HDAg and GFP (Fig. 4B, C and D). These observations were maintained for cells expressing the HDV RNP (Fig. 4D). Interestingly, we observed that the propagation of the S-HDAg gives rise to both nuclear and cytoplasmic localization of the protein (Fig. 4B) whereas mostly cytoplasmic localization was observed for the L-HDAg (Fig. 4C) and the localization of HDAg in cells, initially HDV-naive, expressing the RNP is mostly in the nucleus (Fig. 4D).

HDAg expression increases extracellular vesicle secretion.

The exosomes are nano-sized (50 nm-150 nm) extracellular vesicles (EV). To investigate the concentration and the size distribution of extracellular vesicles secreted in the supernatant of Huh7 cells upon transfection with pClneo, pCIHD24, pCIHD27 or pSVLD3, we used the NANOSIGHT NS300. We note that when transfected with pSVLD3 (expressing HDV RNP) cells secreted significantly more EV compared to pClneo transfected cells (Fig. 5B and D, respectively). In addition, the size distribution of EV secreted from pSVLD3 transfected cells (the majority around 100 nm and 150 nm) is different compared to EV from pCIneo transfected cells (the majority less than 100 nm in size) (Fig. 5B). This suggests that the composition of EV from pSVLD3 transfected cells is different compared to EV from pClneo transfected cells. The concentration of EV secreted from pCIHD24 (S-HDAg) and pCIHD27 (L-HDAg) transfected cells are significantly higher than EV from pCIneo transfected cells (Fig. 5C and D). However, the effect was less pronounced for cells expressing L-HDAg (Fig. 5C and D). The size distribution of EV from pCIHD24 (S-HDAg) and pCIHD27 (L-HDAg) transfected cells is similar.

HDV S-HDAg and L-HDAg are present in exosomes.

We then sought to explore the possibility that the HDAg might be present specifically in the exosomes. To this end, we purified exosomes, by serial filtration of supernatants following exosome isolation using Exoquick, from supernatant of Huh7 cells transfected with pClneo, pCIHD24, pCIHD27 or pSVLD3. It is important to mention that cells were cultivated in exosome-free FBS media to avoid contamination of the media with the bovine exosomes. Besides, the purification of exosomes from pSVLD3 transfected cells does not contain HDV virions due to the absence of HBV envelope protein expression in our setting. Here it is also important to mention that the exosomes from pSVLD3 transfected cells were collected at 8 days post transfection. At this timepoint, the edition process of the HDV RNA has occurred, leading to the expression of L-HDAg and to the production of mature RNPs containing both HDAg isoforms. Samples were analyzed by western blotting (Fig. 6A). To clearly identify exosomes, we monitored two enriched exosomal protein markers (TSG101 and CD81) (Conde-Vancells et al., 2008). As a control for purification we monitored the presence of ER-resident protein calnexin (Conde-Vancells et al., 2008; Lotvall et al., 2014) which is expected to be absent from exosome preparations. Equal protein amounts of extracts prepared from cells or exosomes were subjected to western blotting analysis (Fig. 6B, C and D). As expected, calnexin was detected in cellular extracts (Fig. 6B, C and D). However, under the same conditions, calnexin could not be detected in the exosome preparations (Fig. 6B, C and D). These results show that the exosome preparation was not contaminated with material derived from other cellular compartments. Importantly, we detected a clear enrichment of exosomal proteins (TSG101 and CD81) in our preparations (Fig. 6B, C and D), supporting the postulate that the purified vesicles are indeed exosomes (Lotvall et al., 2014). Our

results clearly show that exosomes derived from pCIHD24 and pCIHD27 transfected cells contain S-HDAg and L-HDAg, respectively (Fig. 6B and C). This means that the incorporation of the isoforms of HDAg does not require the HDV viral genome. Additionally, the exosomes isolated from pSVLD3 transfected cells (expressing the HDV RNP) contains both HDAg isoforms (Fig. 6D).

Exosomes harbor HDV RNA

Following the detection of HDAg within exosomes and knowing that these vesicles mediate cell-to-cell communication (Mathieu et al., 2019) and receptor-independent transmission of viruses (Khan et al., 2017), we sought to evaluate the ability of the exosomes derived from pSVLD3 transfected cells to transfer their content (HDAg and/or viral RNA) to naïve hepatocytes cells. To this end, we exposed naïve Huh7 cells to purified exosomes from pSVLD3 or pClneo transfected cells. Cells were then stained using an anti-HDAg antibody and analyzed by confocal fluorescence microscopy at day 3 and 7 post exposure (Fig. 7A). At day 3, the staining appeared to localize in a cytoplasmic subcellular compartment (likely endosomes), while at day 7, more intense puncta could be observed in addition to the structures observed at day 3 (Fig. 7B). While it is not possible to completely rule out the possibility of a neosynthesized HDAg at day 7, this should result in stronger nuclear staining (Bichko & Taylor, 1996). At this stage it seems more likely that the HDV components (HDAg and genome) remain trapped in endosomal and lysosomal structures. It is known that, in vitro, nucleic acids cannot be released in the cytoplasm and remain trapped in late endosomes (Allen et al., 2019; Yang et al., 2015a). Interestingly the UNC7938 compound has been shown to allow the release of oligonucleotides from endosomes in vitro (Allen et al., 2019; Blanchet et al., 2019a;

Yang *et al.*, 2015a). Based on the observation of a punctuated staining of HDAg in cells, likely resulting from endosomal/lysosomal sequestration, we sought to investigate the ability of UNC7938 to allow the release of HDV components and to initiate *the novo* HDV RNA replication (Fig. 7C). At day 7 post inoculation, cells were analyzed for their HDV RNA content by RT-qPCR. The results show a significant difference in signal intensity between exosome-treated cells in the presence or absence of UNC7938 treatment (Fig. 7D). Importantly total RNA was also subjected to a mock reverse transcription prior to qPCR to ascertain the absence of plasmid contamination. These findings demonstrate that exosomes contain HDV RNA, and further suggest the ability of the released viral RNA (upon UNC7938 treatment) to replicate in the target cell. Our results are in line with a recently published work that shows the presence of HDV RNA into extracellular vesicles (Jung *et al.*, 2020).

DISCUSSION

Infection by HDV usually leads to aggravation of liver dysfunction and higher risks of severe liver disease (Puigvehi et al., 2019), as compared to infection with HBV alone. Originally known as a HBV satellite virus (Mentha et al., 2019) (Huan Yan et al., 2012), a recent publication has suggested that HDV can exploit other enveloped viruses unrelated to HBV to complete its life cycle and to propagate to naive cells (Perez-Vargas et al., 2019). Moreover, receptor-independent transmission of viruses through exosomes has been demonstrated for many viruses including the Human immunodeficiency virus (HIV), Hepatitis C virus (HCV) and Hepatitis B virus (HBV) (Bukong et al., 2014; Li et al., 2019; Zhang et al., 2018). However, little is known about the transmission of HDV via exosomes secreted from hepatocytes, but recently it has been demonstrated that extracellular vesicles from HDV infected cells harbor viral HDV RNA and induce a proinflammatory cytokine response in human peripheral blood mononuclear cells and macrophages (Jung et al., 2020). Such studies are important to gain a better understanding of how viruses hijack the membrane trafficking of the host cell machinery to spread to neighboring and distant cells and to modulate the host immune response.

Our first observations have shown that HDAg expressed from Huh7 transfected cells can be detected in the surrounding non-transfected cells. Accordingly, we have investigated and verified whether the HDAg was transferred from transfected to non-transfected cells. The initial observations were confirmed in a model of co-culture of peGFP transfected cells and HDAg transfected cells. Interestingly, in the first figures (Fig.1B, Fig.2B, Fig.4A and C), the localization of L-HDAg in the surrounding cells and double positive cells is mostly cytoplasmic, however the localization of S-HDAg in the surrounding cells and

double positive cells can be either nuclear or cytoplasmic. As well, the percentage of double positive cells in cells expressing S-HDAg is significantly higher compared to cells expressing L-HDAg. These results together suggest that the propagation of S-HDAg can be either caused by a cell-to-cell transmission by direct cell-cell contact between neighboring cells, or by transmission between distant cells mediated by extracellular vesicles.

Although the percentage of double positive cells when expressing the L-HDAg is less pronounced in the FACS results, we cannot ignore the fact that L-HDAg can propagate through its incorporation into exosomes as demonstrated with the confocal microscopy and the western blotting results.

It has been demonstrated that different hepatitis viruses such as HAV, HEV, HCV, and even HBV (Khan *et al.*, 2017), exploit the exosomes either to be engulfed, like HEV (Nagashima *et al.*, 2014) and HAV (Feng *et al.*, 2013), or to transmit the infection to other hepatocytes (HBV, HCV) (Shen *et al.*, 2017). Therefore, we hypothesized that exosomes might be involved in a virion-free propagation of HDV components.

In this study, we demonstrate that the expression of the ribonucleoprotein significantly increases the concentration of secreted extracellular vesicles. Most of these vesicles have a size that ranges approximately between 100 nm and 150 nm, the typical size of exosomes (50-150 nm) (Mathieu *et al.*, 2019) suggesting that the extracellular vesicles quantified might be mostly exosomes. In addition, we show that the size distribution of extracellular vesicles from cells expressing the ribonucleoprotein is different compared to extracellular vesicles derived from pCIneo transfected cells suggesting a modification in the composition of extracellular vesicles upon expression of the HDV ribonucleoprotein.

This possibility should be investigated in future work. Interestingly a recent publication has demonstrated the ability of the HBx protein of HBV to increase the secretion of extracellular vesicles, including exosomes (Kapoor et al., 2017) and that the composition of exosomes can be modified in infected HBV cells compared to uninfected cells (Jia et al., 2017). Further, our molecular characterization of secreted EV by western blotting shows clearly that these EV are enriched with exosomal protein markers (TSG101 and CD81) and don't express ER-resident protein calnexin thereby confirming that the exosome preparation was not contaminated with material derived from other cellular compartments. Isolated exosomes from pSVLD3 transfected Huh7 supernatant contain HDAg (Fig 6B, C and D) as well as HDV RNA (Fig 7D). Therefore, we speculate that these components could be internalized into exosomes as a structured HDV RNP. This hypothesis is reinforced by the enhanced propagation of HDAg that was observed upon transfection with pSVLD3 as compared to HDAg expressing plasmids (Fig 3B). Indeed, even though the HDV promoter in pSVLD3 produces significantly less HDAg (Fig. 3C), compared to pCIHD24 or pCIHD27 which produce HDAg from a CMV promoter, more HDAg was observed in the neighboring cells (Fig. 3B). These observations could also be explained by the fact that pSVLD3 promoter launches a rolling circle replication of the RNA, increasing the production of HDAg over time. This amplification process is not present on pCIHD24 and pCIHD27 plasmids. Also, when cells transfected with pSVLD3 were co-cultured with peGFP-transfected cells, we observed the presence of double positive cells with mostly nuclear localization of HDAg (Fig. 4D) However when Huh7 cells were cultured with purified exosomes from pSVLD3 transfected cells we observed a cytoplasmic localization of HDAg (Fig. 7D). These results suggest that there may be two

different mechanisms of RNP transmission between cells, either a cell-to-cell by direct contact between neighboring cells which is reflected by the nuclear localization or mediated by extracellular vesicles including exosomes. The cytoplasmic localization of HDAg seems more likely due to entrapment of the HDV components (HDAg and genome) in endosomal and lysosomal structures. Our study shows that endosomal release, using UNC7938, significantly increases the quantity of the viral genome detected in cells exposed to exosomes. This result suggests that an overwhelming part of the HDV genome and/or RNP remains entrapped inside endosomal vesicles and are likely degraded by the lysosomal pathway. It is known that it is challenging, in vitro, for the oligonucleotides to escape the endosomal pathway and to reach their targets (Juliano, 2018). As well the isolated exosomes from pSVLD3 transfected cells harbor the two isoforms of HDAg and viral RNA meaning that the RNP is also probably present in the exosomes. Our results demonstrate that exosomes might contribute to the propagation of the infection. However, a deeper analysis of the virus-free propagation of the HDV genome and the re-initialization of the rolling-circle replication in naïve cells is warranted. Propagation of HDV by the endosomal pathway could be to the advantage of the virus, through its escape from the immune response, or to adversely enhance the innate immune response and trigger the activation of immune cells. It has been demonstrated for HBV that exosomes secreted from hepatocytes deliver viral proteins to recipient cells, like monocytes, macrophages and NK cells, so as to regulate the immune response (Jia et al., 2017; Kouwaki et al., 2016; Yang et al., 2017c). Furthermore, it has been recently shown that extracellular vesicles derived from HDV infected cells induce a proinflammatory cytokine response in macrophages and human peripheral blood

mononuclear cells (Jung et al., 2020). We assume that exosomes containing HDV components may modulate the immune response and thereby explaining the observation, in contrast to mono-infection with HBV, HBV-HDV co-infection leads to high level of activation of the innate immune system (Giersch et al., 2015). Exosome- containing HDV components may also explain the observation that HDV can persist in cells for weeks in the absence of HBV and for months after liver transplantation (Giersch et al., 2019). Recently, it has been shown that exosomes derived from HCV-infected hepatocytes are internalized within the hepatic stellate cells (HSC) and increase the expression of profibrotic markers by the activated HSC cells. Therefore, the HCV exosomes may be implicated in the induction of liver fibrosis (Devhare et al., 2017). It is also known that the presence of HDV in the liver accelerates the pathogenesis of liver diseases including fibrosis (Gilman et al., 2019). The causes of this rapid progression are not well known but the strong induction of exosome secretion by HDV replicating cells may contribute to the pathogenesis and fibrosis caused by HDV as observed with HCV (Devhare et al., 2017). This possibility should be evaluated in future work.

In summary, we have shown that at least certain viral components present in exosomes and enter naive hepatocytes. These exosomes could mediate the transfer of HDAg and the viral RNA between hepatocytes *in vitro*, independently to HBV. Therefore, the HDV could propagate to other hepatocytes in the absence of HBV or it could enter PBMCs cells to modulate the immune response.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture, reagents and antibodies. Huh7 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco) and supplemented with 10 % v/v fetal bovine serum (FBS, performance wisent), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 2 mM L-glutamine (Gibco) at 37 °C, 5% CO2, in a humidified incubator. Fetal Bovine Serum, Exosome-Depleted was purchased from Thermo Fisher Scientific. Exoquick-TC reagent (EXOTC10A-1) was purchased from System Biosciences. UNC7938 was previously used (Blanchet *et al.*, 2019a) and is a generous gift from Dr. Juliano (Yang *et al.*, 2015a).

Rabbit polyclonal anti TSG101 was purchased from MyBioSource (MBS9201535), mouse monoclonal anti CD81 was purchased from Santa Cruz (sc-23962). Rabbit polyclonal anti Calnexin (2679T) was bought from Cell Signaling. Anti-HDAg antibody-positive human serum was previously used (Khabir *et al.*, 2020; Komla-Soukha & Sureau, 2006).

Plasmids and transfection. HDV recombinant plasmid pSVLD3 was used for the replication of HDV RNA and production of HDV RNP. It contains three head-to-tail copies of full-length HDV cDNA (Komla-Soukha & Sureau, 2006; Kuo et al., 1989). The plasmids pCIHD24, pCIHD27 were used for the expression of S-HDAg, and L-HDAg, respectively, as previously described (Khabir *et al.*, 2020; Komla-Soukha & Sureau, 2006). pCIneo and peGFP were purchased from Promega and Clontech, respectively. pcDNA3 mRuby2 (named in the results section pmRuby2) plasmid is from Addgene (Lam *et al.*, 2012).

Exosome isolation. The supernatant from transfected cells incubated with DMEM and supplemented with 5% exosome-depleted serum was collected. Then, it was centrifuged at high speed for 10 mins at 4°C to remove cell debris. The supernatant was transferred into centrifugal Filter Units (Amicon Ultra centrifugal Filters) followed by centrifugations at

 $3500 \times g$ for 20 min. After serial filtration of supernatants, the concentrated culture supernatants were mixed with the appropriate volume of Exoquick for exosome isolation according to the manufacturers' specification. The isolated exosomes were re-suspended in 1× phosphate buffered saline (PBS) and then either lysed with the appropriate lysis buffer depending on the application or conserved in -20°C for further applications.

NANOSIGHT NS300. The supernatant from transfected cells incubated with DMEM and supplemented with 5% exosome-depleted serum was collected. Samples were centrifuged to eliminate cellular debris. They were then diluted in PBS to a final volume of 1 ml and analyzed with NANOSIGHT NS300. The purified exosomes were also quantified with NANOSIGHT NS300.

Flow Cytometry (FACS). Cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 10 minutes. Then they were permeabilized with 0.5 % triton x100. They were also washed with FACS buffer with saponin (2% BSA, 0.1% sodium azide, 0.3% saponin). Next, they were stained with anti-HDAg antibody-positive human serum at 1:1.000 dilution for 1h at 4°C. Then cells were washed and incubated with the corresponding secondary Alexa fluor antibody for 1h at 4°C. Finally, the samples were analyzed with Flow cytometry FACSDiva Version 6.2. The results were analyzed with FlowJo Version10.6.2.

Quantitative real-time PCR. Intracellular RNA was extracted using an Aurum total RNA mini kit (Biorad). Also, cDNA was obtained by using iScript SELECT cDNA (Biorad). To control the DNA contamination, each sample was transcribed in the presence of reverse transcriptase enzyme, and in the absence of reverse transcriptase enzyme. Then, the quantification of HDV RNA was determined by SYBR Green real-time PCR. The

sequences for forward and reverse primers are HDV-F GGGATTTTCGTCCTCTATCTTC, HDV-R AGAGAAGAGATCCTCGAGCAG.

Staining with anti-HDAg antibody for confocal microscopy analysis. Huh7 cells were transfected with the different plasmids as specified in the figure legend. Cells were grown on glass coverslips. Then, they were fixed using 4% formaldehyde in PBS for 10 min. They were permeabilized with 0.2% triton 100x for 30 min. Then, coverslips were incubated with blocking solution for 30 min at room temperature (PBS, 3% bovine serum albumin, 10% FBS). After washing with PBS, the coverslips were incubated with anti-HDAg antibody-positive human serum at 1:1,000 dilution for 1h at room temperature. The cells were then washed and incubated with the corresponding secondary Alexa fluor ™ antibody for 1h at room temperature. Then the coverslips were washed and stained with 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) for 15 min at room temperature and mounted on glass slides with ProLong Gold Antifade mountant (Invitrogen). The coverslips were analyzed using confocal microscopy (Zeiss LSM 780).

Western blotting. Cells or isolated exosomes were lysed in Pierce lysis buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM EDTA, 5% glycerol) and supplemented with protease inhibitor (Roche). The BCA protein assay kit (Pierce) was used to normalize the total protein content in the different lysates (cellular extract and exosomes extract). Equivalent amounts of protein were subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Bio-Rad). The membranes were blocked 30 min at room temperature (RT) with PBS-5% milk, and then incubated overnight at 4°C with primary antibodies in PBS-0.1% BSA. Then, the membranes were washed with 0.4% Tween 20 in PBS. Next, they

were incubated for 1h at RT, corresponding to the secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase in PBS-5% milk. Proteins' bands were visualized with the Clarity western ECL (Bio-Rad) using ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad).

Statistics. The results were analyzed statistically, using two-tailed and unpaired *t* test with GraphPad Prism 5. P-values below 0.05 were considered statistically significant (*P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001). The values are expressed as the mean ± the standard error of the mean of at least three independent experiments.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jessy Tremblay for his technical support. We thank Ridha Bouich and Richard Boulon for proofreading the manuscript. This work was supported by a grant from NSERC of Canada to PL. We thank Doctor Rudolph L. Juliano for generously providing the UNC7938 compound. The pcDNA3-mRuby2 plasmid was a gift from Michael Lin (Addgene plasmid # 40260).

REFERENCES

- Allen J, Najjar K, Erazo-Oliveras A, Kondow-McConaghy HM, Brock DJ, Graham K, Hager EC, Marschall ALJ, Dubel S, Juliano RL, Pellois JP. 2019. Cytosolic Delivery of Macromolecules in Live Human Cells Using the Combined Endosomal Escape Activities of a Small Molecule and Cell Penetrating Peptides. ACS Chem Biol 14:2641-2651.
- Bichko VV, Taylor JM. 1996. Redistribution of the delta antigens in cells replicating the genome of hepatitis delta virus. J Virol 70:8064-70.
- Blanchet M, Sinnathamby V, Vaillant A, Labonte P. 2019. Inhibition of HBsAg secretion by nucleic acid polymers in HepG2.2.15cells. Antiviral Res 164:97-105.
- Bukong TN, Momen-Heravi F, Kodys K, Bala S, Szabo G. 2014. Exosomes from hepatitis C infected patients transmit HCV infection and contain replication competent viral RNA in complex with Ago2-miR122-HSP90. PLoS Pathog 10:e1004424.
- Casey JL. 2012. Control of ADAR1 editing of hepatitis delta virus RNAs. Curr Top Microbiol Immunol 353:123-43.
- Chan BD, Wong WY, Lee MML, Cho WCS, Yee BK, Kwan YW, Tai WCS. 2019. Exosomes in inflammation and inflammatory disease. Proteomics 19:1800149.
- Conde-Vancells J, Rodriguez-Suarez E, Embade N, Gil D, Matthiesen R, Valle M, Elortza F, Lu SC, Mato JM, Falcon-Perez JM. 2008. Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. J Proteome Res 7:5157-66.
- Devhare PB, Sasaki R, Shrivastava S, Di Bisceglie AM, Ray R, Ray RB. 2017. Exosome-Mediated Intercellular Communication between Hepatitis C Virus-Infected Hepatocytes and Hepatic Stellate Cells. J Virol 91.
- Edgar JR. 2016. Q&A: What are exosomes, exactly? BMC Biol 14:46.
- Feng Z, Hensley L, McKnight KL, Hu F, Madden V, Ping L, Jeong SH, Walker C, Lanford RE, Lemon SM. 2013. A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. Nature 496:367-71.
- Giersch K, Allweiss L, Volz T, Helbig M, Bierwolf J, Lohse AW, Pollok JM, Petersen J, Dandri M, Lutgehetmann M. 2015. Hepatitis Delta co-infection in humanized mice leads to pronounced induction of innate immune responses in comparison to HBV mono-infection. J Hepatol 63:346-53.
- Giersch K, Bhadra OD, Volz T, Allweiss L, Riecken K, Fehse B, Lohse AW, Petersen J, Sureau C, Urban S, Dandri M, Lütgehetmann M. 2019. Hepatitis delta virus persists during liver regeneration and is amplified through cell division both in vitro and in vivo. Gut 68:150-157.
- Gilman C, Heller T, Koh C. 2019. Chronic hepatitis delta: A state-of-the-art review and new therapies. World Journal of Gastroenterology 25: 4580-4597.
- Glenn JS, Watson JA, Havel CM, White JM. 1992. Identification of a prenylation site in delta virus large antigen. Science 256:1331-3.
- Hessvik NP, Llorente A. 2018. Current knowledge on exosome biogenesis and release. Cell Mol Life Sci 75:193-208.
- Huang C, Chang SC, Yang HC, Chien CL, Chang MF. 2009. Clathrin-mediated post-Golgi membrane trafficking in the morphogenesis of hepatitis delta virus. J Virol 83:12314-24.

- Jia X, Chen J, Megger DA, Zhang X, Kozlowski M, Zhang L, Fang Z, Li J, Chu Q, Wu M, Li Y, Sitek B, Yuan Z. 2017. Label-free Proteomic Analysis of Exosomes Derived from Inducible Hepatitis B Virus-Replicating HepAD38 Cell Line. Mol Cell Proteomics 16:S144-S160.
- Juliano RL. 2018. Intracellular Trafficking and Endosomal Release of Oligonucleotides: What We Know and What We Don't. Nucleic Acid Ther 28:166-177.
- Jung S, Altstetter SM, Wilsch F, Shein M, Schütz AK, Protzer U. 2020. Extracellular vesicles derived from Hepatitis-D Virus infected cells induce a proinflammatory cytokine response in human peripheral blood mononuclear cells and macrophages. sciencematters.
- Kapoor NR, Chadha R, Kumar S, Choedon T, Reddy VS, Kumar V. 2017. The HBx gene of hepatitis B virus can influence hepatic microenvironment via exosomes by transferring its mRNA and protein. Virus Res 240:166-174.
- Khabir M, Aliche AZ, Sureau C, Blanchet M, Labonté P. 2020. Hepatitis Delta Virus Alters the Autophagy Process To Promote Its Genome Replication. J Virol 94.
- Khan G, Ahmed W, Philip PS. 2017. Exosomes and Their Role in Viral Infections, Novel Implications of Exosomes in Diagnosis and Treatment of Cancer and Infectious Diseases doi:10.5772/intechopen.69397.
- Komla-Soukha I, Sureau C. 2006. A tryptophan-rich motif in the carboxyl terminus of the small envelope protein of hepatitis B virus is central to the assembly of hepatitis delta virus particles. J Virol 80:4648-55.
- Kouwaki T, Fukushima Y, Daito T, Sanada T, Yamamoto N, Mifsud EJ, Leong CR, Tsukiyama-Kohara K, Kohara M, Matsumoto M, Seya T, Oshiumi H. 2016. Extracellular Vesicles Including Exosomes Regulate Innate Immune Responses to Hepatitis B Virus Infection. Front Immunol 7:335.
- Lam AJ, St-Pierre F, Gong Y, Marshall JD, Cranfill PJ, Baird MA, McKeown MR, Wiedenmann J, Davidson MW, Schnitzer MJ, Tsien RY, Lin MZ. 2012. Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins. Nat Methods 9:1005-12.
- Lee CH, Chang SC, Wu CH, Chang MF. 2001. A novel chromosome region maintenance 1independent nuclear export signal of the large form of hepatitis delta antigen that is required for the viral assembly. J Biol Chem 276:8142-8.
- Li J, Liu K, Liu Y, Xu Y, Zhang F, Yang H, Liu J, Pan T, Chen J, Wu M, Zhou X, Yuan Z. 2013. Exosomes mediate the cell-to-cell transmission of IFN-alpha-induced antiviral activity. Nat Immunol 14:793-803.
- Li S, Li S, Wu S, Chen L. 2019. Exosomes Modulate the Viral Replication and Host Immune Responses in HBV Infection. Biomed Res Int 2019:2103943.
- Lotvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzas EI, Di Vizio D, Gardiner C, Gho YS, Kurochkin IV, Mathivanan S, Quesenberry P, Sahoo S, Tahara H, Wauben MH, Witwer KW, Thery C. 2014. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. J Extracell Vesicles 3:26913.
- Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, Thery C. 2019. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. Nat Cell Biol 21:9-17.
- Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. 2010. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. J Proteomics 73:1907-20.

- Mathivanan S, Simpson RJ. 2009. ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. Proteomics 9:4997-5000.
- Mei Chao, Sen-Yung Hsieh, Taytor AJ. 1990. Role of Two Forms of Hepatitis Delta Virus Antigen a Evidence for a Mechanism of Self-Limiting Genome Replication. J Virol 64:5066-5069.
- Mentha N, Clement S, Negro F, Alfaiate D. 2019. A review on hepatitis D: From virology to new therapies. J Adv Res 17:3-15.
- Nagashima S, Jirintai S, Takahashi M, Kobayashi T, Tanggis, Nishizawa T, Kouki T, Yashiro T, Okamoto H. 2014. Hepatitis E virus egress depends on the exosomal pathway, with secretory exosomes derived from multivesicular bodies. J Gen Virol 95:2166-75.
- Perez-Vargas J, Amirache F, Boson B, Mialon C, Freitas N, Sureau C, Fusil F, Cosset FL. 2019. Enveloped viruses distinct from HBV induce dissemination of hepatitis D virus in vivo. Nat Commun 10:2098.
- Puigvehi M, Moctezuma-Velazquez C, Villanueva A, Llovet JM. 2019. The oncogenic role of hepatitis delta virus in hepatocellular carcinoma. JHEP Rep 1:120-130.
- Record M, Carayon K, Poirot M, Silvente-Poirot S. 2014. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiologies. Biochim Biophys Acta 1841:108-20.
- Ryu WS, Bayer M, Taylor J. 1992. Assembly of hepatitis delta virus particles. J Virol 66:2310-5.
- Schorey JS, Cheng Y, Singh PP, Smith VL. 2015. Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. EMBO Rep 16:24-43.
- Shen J, Huang CK, Yu H, Shen B, Zhang Y, Liang Y, Li Z, Feng X, Zhao J, Duan L, Cai X. 2017. The role of exosomes in hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. J Cell Mol Med 21:986-992.
- Sureau C, Negro F. 2016. The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis. J Hepatol 64:S102-S116.
- Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. 2002. Exosomes: composition, biogenesis and function. Nat Rev Immunol 2:569-79.
- Urbanelli L, Buratta S, Tancini B, Sagini K, Delo F, Porcellati S, Emiliani C. 2019. The Role of Extracellular Vesicles in Viral Infection and Transmission. Vaccines (Basel) 7.
- Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat Cell Biol 9:654-9.
- Wang YC, Huang CR, Chao M, Lo SJ. 2009. The C-terminal sequence of the large hepatitis delta antigen is variable but retains the ability to bind clathrin. Virol J 6:31.
- Wedemeyer H, Hardtke S, Manns MP. 2013. Treatment of hepatitis Delta. Clinical Liver Disease 2:237-239.
- Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, Huang Y, Qi Y, Peng B, Wang H, Fu L, Song M, Chen P, Gao W, Ren B, Sun Y, Cai T, Feng X, Sui J, Li W. 2012. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. Elife 1:e00049.
- Yang B, Ming X, Cao C, Laing B, Yuan A, Porter MA, Hull-Ryde EA, Maddry J, Suto M, Janzen WP, Juliano RL. 2015. High-throughput screening identifies small molecules that enhance the pharmacological effects of oligonucleotides. Nucleic Acids Res 43:1987-96.

- Yang X, Li H, Sun H, Fan H, Hu Y, Liu M, Li X & Tang H (2017b) Hepatitis B Virus-Encoded MicroRNA Controls Viral Replication. *J. Virol.* 91(10):1-18.
- Yang Y, Han Q, Hou Z, Zhang C, Tian Z, Zhang J. 2017. Exosomes mediate hepatitis B virus (HBV) transmission and NK-cell dysfunction. Cell Mol Immunol 14:465-475.
- Zhang W, Jiang X, Bao J, Wang Y, Liu H, Tang L. 2018. Exosomes in Pathogen Infections: A Bridge to Deliver Molecules and Link Functions. Front Immunol 9:90.
- Zhang Y, Liu Y, Liu H, Tang WH. 2019. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. Cell Biosci 9:19.

FIGURE LEGENDS

FIG 1 HBV-independent spreading of L-HDAg *in vitro*. (A) Huh7 cells were co-transfected with peGFP plasmid and pCIHD27 coding for GFP protein and L-HDAg respectively. At different time points as indicated, cells were fixed and then stained with anti-HDAg antibody from human serum (red) and with DAPI (blue). (B) the results were analyzed by confocal microscopy and a representative example is shown for each time point. As negative control, we co-transfected the cells with peGFP and pCIneo plasmids. These cells were also stained with anti-HDAg antibody and DAPI. This experiment was repeated more than three times.

FIG 2 HBV-independent spreading of S-HDAg *in vitro*. (A) Huh7 cells were co-transfected with peGFP and pCIHD24 plasmids and fixed after 24 h and 72 h. Cells were then stained with anti-HDAg antibody from human serum (red). The nucleus was stained with DAPI (blue). (B) the results were analyzed by confocal microscopy and a representative example was shown for each time point. The negative control consists of co-transfected cells with peGFP and pCIneo which were stained with anti-HDAg antibody and DAPI. The experiment was repeated at least three times.

FIG 3 Quantification of double positive cells by FACS. (A) Huh7 cells were transfected with pcDNA3 mRuby2 (pmRuby2), pSVLD3, pCIHD24 or pCIHD27 separately. These cells were then mixed with GFP-expressing cells and incubated for 72 h. After fixing, the cells were stained with anti-HDAg antibody from human serum and analyzed by FACS. Untransfected mock cells stained with anti-HDAg antibody from human serum were used as a control for settings. (B) The percentages of double positive cells (GFP+ and HDAg +) were quantified. The experiment was repeated at least three times. (C) Huh7 cells were

transfected with pSVLD3, pCIHD24, pCIHD27 or an empty plasmid which was used as negative control. Then the expression level of HDAg was evaluated with western blotting. **FIG 4** HDV components propagate between hepatocytes. (A) Huh7 cells were transfected with pSVLD3, pCIHD24 or pCIHD27 separately. Then each pool of transfected cells was mixed (co-cultured) with cells transfected with peGFP separately for 72 h. After fixing, the cells were stained with anti-HDAg antibody from human serum (red) and with DAPI (blue). (B) Represents two different examples of cells transfected with pCIHD24 (S-HDAg) and co-cultured with peGFP (GFP) transfected cells. (C) Shows two different representative examples of cells transfected with pCIHD27 (L-HDAg) and co-cultured with peGFP (GFP) transfected cells. The experiment was repeated at least three times.

FIG 5 HDAg expression increases the concentration of extracellular vesicles. (A) Huh7 cells were transfected with pClneo, pSVLD3, pCIHD24 or pCIHD27. Then, cells were washed and the media were replaced with a DMEM medium with exosome-depleted FBS. After 48 h of accumulation, supernatant was collected and then analyzed with NANOSIGHT NS300. (B) The concentration and the size distribution of extracellular vesicles (EV) from pSVLD3 and pClneo transfected cells are shown. (C) The concentration and the size distribution of EV from pCIHD24, pCIHD27 and pClneo are shown. (D) The concentration of EV is presented as relative units (RU) normalized to pClneo transfected cells. The values represent the average of three separate experiments.

FIG 6 Exosomes contain HDAg. (A) Two sets of transfections were done; the first set is Huh7 cells transfected with pSVLD3 or pClneo. The media was replaced with DMEM -FBS depleted exosomes at 6-day post transfection. After 48h, Huh7 cells were harvested. The second set is Huh7 cells transfected with pCIHD24, pCIHD27 or pClneo. The Third day post transfection the media was replaced with DMEM medium with FBS depleted exosomes, after 48h, Huh7 cells were harvested. Proteins extracted from exosomes and from cells were analyzed with western blotting as indicated. (B, C and D) The expression of exosome markers (TSG101 and CD81) and an endoplasmic reticulum marker (calnexin) was evaluated in cellular and exosomal extracts in addition to HDAg expression. One representative of at least three independent blots is shown for each condition.

FIG 7 Exosomes deliver HDV components to targeted naive cells. (A) Naïve Huh7 cells were cultivated with 100,000 exosomes per cells derived from pSVLD3 transfected cells or from pCIneo transfected cells for 3 days or 7 days. (B) Then cells were fixed and stained with anti-HDAg antibody from human serum (red) and DAPI (blue). (C) Huh7 were cultivated with 100,000 exosomes per cell (originating from pSVLD3 or pCIneo transfected cells) for 24 h. Then UNC7938 (15 μ M) was added for 2 h then washed. Seven days later, cells were lysed. (D) The samples were analyzed by RT-qPCR and qPCR.

FIG 1









FIG 3



127

9days










FIG 6





FIG 7





CHAPITRE 4: DISCUSSION GÉNÉRALE

En réponse aux différents types de stress, la cellule développe différentes stratégies biologiques pour maintenir une homéostasie cellulaire, parmi lesquelles l'autophagie et la sécrétion des exosomes (Xu *et al.*, 2018). Ainsi, nous avons constaté que le stress induit par la réplication virale du VHD provoque non seulement l'activation du processus autophagique, mais également la sécrétion d'exosomes dans les lignées cellulaires hépatiques.

11 IMPLICATION DE L'AUTOPHAGIE DANS LE CYCLE DE RÉPLICATION DU VHB ET DU VHD

Dans la première étude, nous avons évalué le rôle de l'autophagie lors du cycle de réplication du VHB et du VHD. En premier lieu, nous avons confirmé l'effet de potentialisation de l'autophagie par l'expression du VHB, et réciproquement l'effet proviral de l'autophagie sur le VHB. Dans un deuxième temps et selon une démarche similaire, nous avons évalué les interactions réciproques entre l'autophagie et le cycle de réplication du VHD. Finalement, nous avons également étudié l'effet de l'autophagie dans des cellules hépatiques exprimant simultanément les deux virus. Notre étude a été réalisée *in vitro* en utilisant différentes lignées cellulaires hépatiques.

11.1 Implication de l'autophagie dans le cycle de réplication du VHB

Plusieurs études ont suggéré que la protéine HBx active l'autophagie via différentes voies de signalisation (Bagga et al., 2016; Liu et al., 2014; Sir et al., 2010; Tang et al., 2009; Wang et al., 2013; Xie et al., 2016; Zhang et al., 2014; Zhong et al., 2017). Cependant, une autre étude a suggéré que la protéine S-AgHBs induit l'autophagie (Li et al., 2011). Dans notre étude, nous avons montré, dans des conditions nutritives normales, que les protéines HBx et S-AgHBs provoquent toutes les deux une augmentation de l'expression de la protéine LC3II et une accumulation des autophagosomes dans les cellules Huh7. De plus, nos résultats montrent que le VHB ainsi que les deux protéines HBx et S-AgHBs augmentent l'expression de la protéine p62, marqueur de flux autophagique, dans les hépatocytes. Ces données proposent que le VHB bloque la maturation des autophagosomes et inhibe sa dégradation par le flux autophagique. Dans ce cadre, les études concernant le flux autophagiques et le VHB sont controversées. Contrairement à notre étude et les études de (Liu et al., 2014; Sir et al., 2010; Zhong et al., 2017; Zhou et al., 2016) qui ont montré l'inhibition du flux autophagique par le VHB, les travaux de (Lin et al., 2019a; Lin et al., 2019b; Yang et al., 2015b) ont démontré que le VHB est dégradé dans les autolysosomes et que le flux autophagique est activé par le virus. Les raisons à l'origine de ces différents résultats ne sont pas bien connues. Cependant, ces divergences pourraient

s'expliquer par l'utilisation de différents génotypes du VHB, de différents types cellulaires, ainsi que de différentes conditions de culture cellulaire. Par exemple, contrairement au modèle expérimental utilisé dans l'étude de (Tang *et al.*, 2009) nous n'avons pas soumis nos cellules à une carence nutritive. De plus, la différence dans le niveau d'expression des protéines HBx et S-AgHBs, liée aux constructions plasmidiques (promoteurs, séquence de kozak, ect), aux modèles cellulaires et aux agents de transfection utilisés, pourrait être à l'origine des différences de résultats rapportées dans l'ensemble des études.

Plusieurs études ont mis en évidence l'importance de l'autophagie pour la réplication de l'ADN viral du VHB (Sir *et al.*, 2010; Tian *et al.*, 2011), lors de l'enveloppement des virions (Li *et al.*, 2011) et lors de la maturation des virions du VHB (Doring & Prange, 2015; Doring *et al.*, 2018). Dans notre projet, nous avons commencé par confirmer l'interaction entre l'autophagie et le cycle de réplication du VHB dans notre modèle cellulaire. Cette étape de confirmation était nécessaire pour valider notre modèle avant d'amorcer l'étude de l'impact de l'autophagie sur le VHD en mono ou co-expression avec le VHB.

Nos résultats montrent également l'importance du processus autophagique dans le cycle de réplication du VHB. Cependant, l'étape du cycle nécessitant ce processus semble être une phase tardive, après la transcription, la traduction et la reverse transcription. En réponse à l'inhibition de l'expression des gènes autophagiques LC3, ATG5 et ATG7, la quantité des particules de Dane diminue significativement dans le milieu extracellulaire. Cependant, cette inhibition n'affecte pas la quantité intracellulaire d'ADN et d'ARN viral. Il est alors probable que la machinerie autophagique augmente l'assemblage/la sécrétion des particules virales en fournissant une source additionnelle de membranes au site de formation des virions. Nos résultats sont similaires à ceux de deux autres études (Doring *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2011) qui proposent que l'autophagie soit nécessaire pour la maturation/sécrétion des virions du VHB et non pas pour la réplication du génome viral.

Notre étude est la première à évaluer l'autophagie dans des cellules « *knockout* » pour les différents gènes autophagiques ATG5, ATG7 et LC3. Ces « *knockout* » ont été générés en utilisant la technologie de CRISPR-Cas9. Les études de différents groupes cités précédemment ont inhibé l'autophagie en utilisant soit des molécules chimiques (3MA ou wortmannine), soit des siARNs pour différents gènes autophagiques. Ces stratégies sont moins puissantes et fiables et présentent un risque d'avoir une inhibition non spécifique lié à des effets pléiotropiques. Les molécules chimiques chimiques peuvent aussi être toxiques pour la cellule, ce qui pourrait activer l'autophagie et donc amener à une surestimation de niveau de l'autophagie dans la cellule. De

plus il a été montré que la 3MA, connue comme inhibiteur de l'autophagie, a un double rôle en fonction de la durée du traitement et des conditions nutritives. Cela nécessite des précautions lors d'utilisation de cette molécule (Wu *et al.*, 2010). Par conséquent, nos résultats, basés sur des « *knockout* » sont, à notre avis, solides. Toutefois, nous sommes conscients que le « *knockout* » pourrait avoir d'autres effets (toxicité par exemple) sur la cellule, mais nous précisons que nous avons produit des populations stables de cellules « *Knockout* » pour les différents gènes étudiés LC3, ATG5 et ATG7 et non pas des clones de cellules « *knockout* ». Par conséquent, nous réduisons la probabilité d'apparition d'une toxicité ou d'un effet pléiotropique majeur. Pour s'assurer que les « *Knockout* » n'affectent pas l'efficacité de transfection par différents plasmides, des tests ont été réalisés par cytométrie en flux avec un plasmide codant pour la GFP. Les résultats ont montré des efficacités similaires (pourcentage de cellules transfectées) pour les différentes lignées cellulaires.

Nous avons bien atteint notre objectif pour cette partie. En effet, nous avons montré que, dans notre modèle cellulaire, la protéine HBx et la protéine S-AgHBs activent l'autophagie, mais inhibent le flux autophagique. Ainsi que l'autophagie exerce un effet proviral lors de la maturation/sécrétion du VHB. Cependant, il serait intéressant d'étudier plus en détail les mécanismes d'interaction entre le VHB et l'autophagie et de vérifier si d'importantes différences sont observables en fonction du génotype.

11.2 Implication de l'autophagie dans le cycle de réplication du VHD

Rappelons que le VHD est un virus satellite du VHB. Son enveloppement dépend entièrement du VHB. Cependant, il est capable de répliquer son génome et de former une ribonucléoprotéine indépendamment du VHB. L'autophagie favorise le cycle de réplication du VHB. Malgré le lien étroit entre ces deux virus, aucune étude n'a été réalisée sur l'implication de l'autophagie dans le cycle de réplication du VHD. Notre étude démontre pour la première fois les liens entre le VHD et l'autophagie (Khabir *et al.*, 2020).

Nous avons observé que les deux isoformes de l'antigène delta, S-AgHD et L-AgHD, induisent une accumulation des autophagosomes dans les cellules hépatiques Huh7, ainsi qu'une augmentation de l'expression de LC3II. Nous pouvons donc déduire que le VHD cible les premières étapes de processus autophagique. Il serait intéressant d'étudier plus précisément le mécanisme d'induction de l'autophagie par les deux isoformes de l'AgHD. Jusqu'à présent, aucune étude expliquant ce mécanisme dans le contexte de réplication du VHD n'a été rapportée. Cependant, en analogie avec les études réalisées sur d'autres virus, nous suggérons

d'investiguer différentes voies d'induction de l'autophagie. Il a par exemple été montré que la S-AgHD favorise l'accumulation des espèces réactives de l'oxygène (Chen *et al.*, 2019). L'accumulation de ces dernières dans la cellule pourrait activer la voie JNK et ainsi favoriser l'activation de l'autophagie à travers la protéine Bécline 1 (Zhong *et al.*, 2017). La production de l'AgHD dans la cellule pourrait également induire le stress du réticulum endoplasmique et la réponse de la protéine dépliée (UPR) qui permet à son tour d'activer l'autophagie. Plusieurs virus, comme le VHB et le VHC, sont connus pour activer l'autophagie à travers la réponse UPR (Li *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014). L'AgHD pourrait, aussi favoriser l'activité du complexe Pl3KC3, et de fait la synthèse de Pl3P, une composante lipidique qui déclenche la formation des autophagosomes dans la cellule. Il a été montré que la protéine HBx du VHB initie l'autophagie selon ce mécanisme (Sir *et al.*, 2010).

L'accumulation des autophagosomes semble être due au blocage du flux autophagique par le VHD. Cela a été déduit à la suite de l'observation de l'accumulation de la protéine p62 dans les cellules exprimant des composants du VHD en comparaison aux cellules naïves. Nous avons également observé l'accumulation de la protéine p62 dans les cellules exprimant des composants du VHD en comparaison aux cellules traitées par la Bafilomycine A1, connu pour bloquer le flux autophagique par l'inhibition de l'acidification des autolysosomes et la fusion des autophagosomes aux lysosomes (Mauvezin & Neufeld, 2015). D'autres outils pourraient être utilisés pour étudier le flux autophagique dans un contexte d'expression transitoire de l'AgHD tels que l'évaluation du niveau d'ARNm de p62 et l'utilisation de la construction mTagRFPmWasabi-LC3 (Figure 4.1) (Klionsky et al., 2016). La protéine p62 est un marqueur largement utilisé pour explorer le flux autophagique (Gottlieb et al., 2015; Klionsky et al., 2016; Mizushima et al., 2010). Il est recommandé de mesurer le niveau d'ARNm de p62 en parallèle avec l'analyse de son expression protéique pour une évaluation plus complète du flux autophagique (Klionsky et al., 2016; Yoshii & Mizushima, 2017) parce que le changement de p62 peut varier en fonction du type cellulaire. Par exemple, dans certains types cellulaires, il a été observé que le niveau protéique global de p62 ne varie pas malgré une induction importante de l'autophagie (Klionsky et al., 2016). La construction mTagRFPmWasabi-LC3 permet de distinguer les autophagosomes des autolysosomes et elle constitue un outil pour évaluer les différentes étapes de flux autophagique (Figure 4.2) (Zhou et al., 2012). Un autre virus hépatique, le VHC, provoque l'inhibition du flux autophagique dans les hépatocytes (Sir et al., 2008; Taguwa et al., 2011; Wang et al., 2015). D'autres virus, comme l'entérovirus D68 (Corona et al., 2018) et le virus influenza de type A (Godbole et al., 2020), ont été montré comme étant capables de bloquer le flux autophagique. Ce blocage de flux semble être nécessaire pour ces virus. Ainsi, il leur permet d'inhiber leur

dégradation et d'augmenter le niveau des facteurs autophagiques qui favorisent le cycle de réplication des virus.



Figure 4.1: Outil d'analyse de flux autophagique par la construction mTagRFPmWasabi

L'accumulation des ponctuations de mTagRFPmWasabi-LC3, fluorescentes en rouge et vert, reflète l'étape de la biogenèse des autophagosomes. Cependant, à un stage tardif de flux, la fusion des autophagosomes aux lysosomes, ainsi que l'acidification du milieu, permet d'éteindre les signaux verts de mWasabi mais conserve les signaux rouges de mTagRFP (Zhou *et al.*, 2012).

Il est intéressant de savoir que les composantes propres au VHD modulent l'autophagie, en favorisant son initiation, tout en bloquant son flux. Rappelons que lors de la co-infection VHB/VHD la réplication du VHB semble être diminuée ou perturbée par le VHD. Ainsi le VHD peut maintenir un niveau autophagique suffisant dans le cas où le VHB ne peut pas l'assurer.

Le mécanisme d'inhibition de flux autophagique par le VHD n'est pas encore documenté. Cependant, en se basant sur les données bibliographiques existant pour d'autres virus nous suggérons quelques hypothèses. L'inhibition du flux autophagique par le VHD pourrait être due à l'inhibition de la fusion des autophagosomes aux lysosomes par l'AgHD. Cette fusion est médiée par différentes protéines exprimées à la surface des autophagosomes (exemples : Syntaxine17, SNAP29) (Itakura *et al.*, 2012) et d'autres exprimées à la surface des lysosomes

(exemples : Rab7, VAMP8) (Nakamura & Yoshimori, 2017). Ainsi, l'AgHD pourrait inhiber l'expression de certains éléments nécessaires pour cette étape, par exemple la diminution d'expression de Rab7 comme c'est le cas pour le VHB (Zhou *et al.*, 2016) ou l'expression de la Syntaxine17 comme c'est le cas pour le VHC (Ren *et al.*, 2016) ou la SNAP29 et Syntaxine17 comme c'est le cas pour le VHC (Ren *et al.*, 2016) ou la SNAP29 et Syntaxine17 comme c'est le cas pour le virus influenza A (IAV) (Godbole *et al.*, 2020). De plus, l'AgHD pourrait inhiber la maturation des autophagosomes en activant Rubicon, connu pour inhiber la maturation. Cette hypothèse est empruntée des travaux réalisés sur le VHC (Wang *et al.*, 2015) et le virus influenza A (IAV H1N1) (Godbole *et al.*, 2020) sur le flux autophagique. Par ailleurs, l'AgHD pourrait perturber l'acidification des lysosomes. Cette perturbation pourrait être causée à la suite d'une interaction de l'AgHD avec V-ATPase.

Les résultats de notre étude ont permis de déterminer l'effet du VHD sur le processus autophagique. Il était également nécessaire d'évaluer l'impact de l'autophagie sur le cycle de réplication du VHD. Ainsi, nous avons créé des lignées cellulaires « knockout » pour certains gènes autophagiques en utilisant la technologie du CRISPR-Cas9. Les gènes que nous avons choisis sont les gènes LC3, ATG5 et ATG7. La LC3 et l'ATG5 ont été choisies pour évaluer séparément l'implication de deux systèmes de conjugaison de l'autophagie (ATG5-12 et LC3II) lors de cycle de réplication du VHD. ATG7 a été choisie pour son implication dans les deux systèmes de conjugaisons, ATG12 et LC3II (Ohsumi & Mizushima, 2004). Cela nous permet de distinguer les effets individuels des deux systèmes de conjugaison. Dans les cellules Huh7 KO pour les gènes autophagiques, nous avons exprimé de façon transitoire le VHD et les protéines d'enveloppe du VHB. Ensuite, nous avons évalué la quantité d'ARN du VHD intracellulaire et extracellulaire ainsi que l'expression intracellulaire de l'AgHD. Nos résultats montrent que l'inhibition de l'expression d'ATG5 réduit significativement le niveau d'ARN du VHD intracellulaire. Cependant, l'inhibition d'expression d'ATG7 et de LC3 montre un effet moins important sur le niveau d'ARN du VHD intracellulaire. Par conséquent, l'ATG5 agit comme un facteur proviral qui est important pour la réplication du VHD. Cependant, Il serait intéressant d'évaluer le rôle du complexe ATG5-12 lors de cycle de réplication du VHD. L'inhibition de ces différents gènes autophagiques ne montre pas un effet additionnel sur la quantité d'ARN extracellulaire du VHD. Cela nous permet de déduire que le facteur autophagique ATG5 exerce un effet proviral lors de réplication d'ARN du VHD. De plus, nous avons observé une diminution importante du niveau d'expression intracellulaire de l'AgHD dans les cellules déficientes en ATG5, LC3 et ATG7. L'inhibition d'expression de l'AgHD, particulièrement dans les cellules déficientes en ATG5, est plus importante que l'inhibition de l'ARN du virus. Cette différence peut être expliquée par le fait

que la technique de RT-qPCR ne permet pas de différencier entre les différentes formes de l'ARN du VHD (ARN génomique, antigénomique et ARNm). Par conséquent, l'inhibition de l'ARNm du VHD pourrait être sous-estimée dans ces conditions.

Plusieurs données de la littérature montrent que l'autophagie favorise la réplication de l'ARN du VHC. En effet, des études ont rapporté que les différentes protéines autophagiques (Beclin1, ATG4B, ATG5 et ATG12) sont des facteurs proviraux (Zhang, 2020). De plus, il a été démontré que l'ATG5 colocalise avec la protéine virale NS5B (ARN polymérase ARN dépendante) et que cette interaction est importante pour favoriser la réplication d'ARN du VHC (Guevin et al., 2010). Une autre étude a montré que le VHC induit la formation des autophagosomes et que les protéines NS5A et NS5B et l'ARN viral colocalisent avec les autophagosomes. Il est de fait admis que ces derniers constituent un site de réplication du VHC (Sir et al., 2012). Deux autres études menées dans notre laboratoire (Fahmy et al., 2018; Fahmy & Labonte, 2017) montrent que le système de conjugaison ATG5-ATG12/ATG16L1 est important pour la réplication d'ARN du VHC. En ce qui concerne le VHB, il a été également montré qu'ATG5 est un facteur proviral pour la réplication du génome viral in vivo (Souris transgéniques pour le génome du VHB) (Tian et al., 2011). De plus, une autre équipe a rapporté l'implication du complexe ATG5-ATG12/ATG16L1 pour l'assemblage/stabilité des nucléocapsides du VHB (Doring & Prange, 2015; Doring et al., 2018). Par conséquent, il est intéressant que les données bibliographiques existantes sur les autres virus hépatiques (VHB et VHC) concordent bien avec nos résultats qui montrent l'implication des différents facteurs autophagiques, spécifiquement l'ATG5, lors de la réplication du VHD.

À ce stade de l'étude, nous n'avons pas déterminé comment les facteurs autophagiques qui ont une localisation cytoplasmique pourraient affecter la réplication intranucléaire du VHD. Lors d'une infection virale, les protéines autophagiques peuvent être relocalisées au site de réplication des virus. Par exemple, il a été démontré que, lors de l'infection par le VHC, le complexe d'élongation ATG5-ATG12/ATG16L1 est recruté au site de réplication de l'ARN viral (Fahmy & Labonte, 2017). En effet, il serait intéressant d'étudier la possibilité d'une relocalisation des protéines autophagiques, telles que LC3, ATG5, ATG12 et ATG16L1, en présence du VHD. Nous avons réalisé un premier test de colocalisation entre la protéine AgHD et ATG16L1 dans les cellules Huh7. Nos résultats montrent un phénotype très intéressant. Ce dernier met en évidence une colocalisation parfaite de l'ATG16L1 avec l'AgHD dans le noyau cellulaire (Figure 4.2). Il se pourrait que le site de colocalisation corresponde au site de réplication du VHD (Bichko & Taylor, 1996; Shih & Lo, 2001). Ces résultats préliminaires feront l'objet d'une étude plus

approfondie dans notre laboratoire mais quelques éléments dans la littérature peuvent nous aider à suggérer une voie à explorer : D'une part, il a été publié que la protéine HuR pour « *human antigen R* », qui se déplace entre le noyau et le cytoplasme, colocalise avec l'AgHD dans les cellules Huh7 et joue un rôle important dans la stabilisation de la S-AgHD (Casaca *et al.*, 2011). D'autre part, récemment il a été montré que la HuR favorise la formation des autophagosomes dans des cellules humains de carcinome hépatocellulaire et interagit avec ATG16 et d'autres facteurs autophagiques tels que ATG5, ATG12, ATG7 (Ji *et al.*, 2019). Cela nous permet d'émettre une hypothèse que la HuR interagit avec ATG16 et forment un complexe stable avec l'AgHD ou avec la RNP du VHD pour favoriser la réplication du VHD.



Figure 4.2: Colocalisation de la RNP du VHD et la protéine autophagique ATG16L1 Les cellules Huh7 ont été transfectées par le plasmide pSVLD3. 5 jours après la transfection, les cellules ont été fixées. Ensuite, elles ont été marquées par l'anticorps anti-ATG16L1 et l'anticorps anti-AgHD (sérum de patient VHD positif). Les cellules ont été analysées par microscopie confocale. « C Marwa Khabir »

11.3 L'effet de l'autophagie dans les cellules hépatiques exprimant simultanément les deux virus (VHB et VHD)

In vivo, le VHD est présent chez un patient soit en co-infection ou surinfection avec le VHB. Les études, *in vitro*, du VHD dans des cellules qui répliquent également le VHB sont peu nombreuses. Il serait intéressant d'exploiter un modèle expérimental cellulaire qui permet la réplication de deux virus simultanément. Ce modèle est important étant donné que les cycles de réplication du VHD et du VHB interfèrent l'un avec l'autre (Pollicino *et al.*, 2011). Par conséquent, nous avons évalué l'effet de l'autophagie dans un contexte de co-réplication des deux virus. L'utilisation d'un système de co-réplication permet d'identifier des voies cellulaires qui inhibent ou modulent les deux virus. Dans cette perspective, nous avons exprimé le VHD de façon transitoire dans les cellules HepG2.2.15 (cellules exprimant constitutivement le VHB) sauvages ou « *Knockout* » pour les gènes autophagiques ATG5, ATG7 et LC3. Les résultats montrent que

l'effet proviral d'ATG5 sur le VHD et le VHB est maintenu dans les cellules HepG2.2.15 exprimant les deux virus. Cependant, pour les cellules Huh7 et HepG2.2.15 déficientes en LC3, nous avons observé deux différents phénotypes pour la sécrétion du VHD. En effet, l'inhibition de LC3 dans les cellules Huh7 montre un effet additionnel sur la sécrétion du VHD qui n'est pas retrouvé dans les cellules HepG2.2.15. Cette observation pourrait être expliquée par le simple fait que les deux lignées utilisées sont différentes et/ou par la présence du VHB dans les cellules HepG2.2.15. Par conséquent, le rôle de LC3 dans le cycle de réplication du VHD nécessite plus d'investigation.

Le développement des lignées VHD inductibles permettant l'initiation de la réplication par la synthèse d'ARN génomique et antigénomique ainsi qu'une lignée inductible codant pour le S-AgHD par la technologie CRISPR-Cas9 sont en cours dans notre laboratoire. L'expression stable du VHD est réalisée dans la lignée HepG2.2.15 (expression constitutive du VHB). Par conséquent, ces lignés seront des outils très utiles pour la poursuite des recherches sur les liens entre le VHD et l'autophagie dans un contexte de co-expression du VHB.

En conclusion, notre étude a permis d'identifier l'ATG5 comme étant un facteur cellulaire proviral pour la réplication du VHD. Notre étude est la première à établir un lien entre l'autophagie et le cycle de réplication du VHD. De plus, il est intéressant d'observer que l'effet proviral d'ATG5 est différent pour le VHB et le VHD. En effet, nous avons montré que l'ATG5 est important pour la réplication intracellulaire du VHD, alors que ce facteur autophagique est nécessaire pour la maturation/sécrétion du VHB. Enfin, l'autophagie pourrait être exploitée comme une stratégie antivirale pour le VHB et le VHD, d'autant que les traitements approuvés pour le VHB ne permettent pas une élimination totale du virus et que ces traitements ne sont pas efficaces pour le VHD.

12 Les exosomes pourraient être des intermédiaires de transmission du VHD entre les cellules hépatiques

Dans la seconde étude, nous avons déterminé l'effet de l'expression du VHD dans les cellules Huh7 sur la sécrétion des exosomes. En parallèle, nous avons évalué la transmission du VHD à travers les exosomes vers les cellules Huh7 naïves.

Cette partie de mon doctorat était basée sur une observation intéressante. Par microscopie confocale, à la suite d'une co-transfection des cellules Huh7 par des plasmides codants pour la S-AgHD (ou la L-AgHD) et la GFP, nous avons observé la présence de cellules exprimant uniquement l'antigène delta. De plus, récemment, il a été montré que le VHD pouvait être secrété en présence des virus enveloppés (HCV, DENV) autre que le VHB (Perez-Vargas *et al.*, 2019).

À ce niveau de l'étude, nous avons émis l'hypothèse d'une transmission de l'AgHD entre cellules en absence des protéines d'enveloppe du VHB. Cette hypothèse ne semble pas avoir fait l'objet d'étude publiée. Cependant, plusieurs études se sont intéressées à la transmission de l'infection indépendamment des récepteurs viraux à la surface des cellules. En effet, il a été montré que différents virus tels que le VIH, le VHC et même le VHB sont transmis à travers les exosomes (Bukong *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2018). Par conséquent, l'hypothèse de transmission du VHD entre les cellules à travers les exosomes fut envisagée. Afin de vérifier que ces observations n'étaient pas des artéfacts techniques, nous avons mis en coculture les cellules transfectées par le plasmide qui code pour l'AgHD et des cellules transfectées par un plasmide qui code pour la GFP. Nos résultats de microscopie confocale ainsi que celles de cytométrie en flux montrent l'apparition significative d'une nouvelle population de cellules qui expriment à la fois la GFP et l'AgHD.

À la suite de cette confirmation, il était important de vérifier notre hypothèse de transmission du VHD entre les cellules à travers les exosomes. Il était intéressant de constater que l'expression de la RNP complète, ou plus simplement des isoformes de l'AgHD engendrent une augmentation significative de la concentration des vésicules extracellulaires sécrétées.

Il a été montré que les vésicules extracellulaires y compris les exosomes sécrétés des cellules infectées par le VHB et dans le sérum des patients infectés par le VHB contiennent différentes composantes virales (AgHBs, la capside, ARN et ADN) (Li et al., 2019). Par ailleurs, les exosomes provenant des cellules infectées par le VHC et des patients contiennent l'ARN viral (Bukong et al., 2014). De fait, il était intéressant de vérifier si les exosomes sécrétées des cellules exprimant le VHD contiennent des composantes virales. Nos résultats d'immunobuvardage de type western montrent clairement que les exosomes purifiés des cellules exprimant la RNP du VHD contiennent les deux isoformes de l'AgHD. Il est important de mentionner que la construction utilisée (pSVLD3) pour exprimer la RNP du VHD ne permet pas de produire les virions du VHD étant donné, qu'elle n'exprime pas les protéines d'enveloppe du VHB nécessaires pour former les virions matures du VHD. Par conséquent, il n'est pas possible que les exosomes isolés soient contaminés avec les virions du VHD. Par ailleurs, les exosomes isolés semblent être non contaminé puisque le marqueur du RE (la calnexine) n'est pas exprimée dans ces exosomes. De plus, ces derniers sont enrichis en marqueurs des exosomes TSG101 et CD81. Il est également possible que ces exosomes contiennent l'ARN viral du VHD, le modèle de transfection transitoire utilisé présente des limitations techniques (importante quantité de plasmides contaminantes) qui nous empêche de confirmer cette possibilité par RT-qPCR. Cependant, une étude publiée

récemment a montré que les exosomes isolés des cellules infectées par le VHD contiennent l'ARN viral du VHD (Jung *et al.*, 2020).

À ce stade de l'étude, il convient de se demander si les exosomes contenant les composantes virales du VHD peuvent déclencher un nouveau cycle de réplication dans des cellules naïves. En effet, nous avons réalisés des expériences préliminaires qui consistent en l'incubation des exosomes spécifiques au VHD avec des cellules naïves et la réalisation d'immunofluorescence à la recherche de signal nucléaire positive de l'AgHD dans les cellules naïves. Cependant, les résultats de ces expériences n'ont pas permis de visualiser une initiation d'infection par les exosomes dans des cellules naïves. Nous avons alors émis l'hypothèse d'une séquestration/dégradation des ARN viraux dans des vésicules intracellulaires. Il est important de noter que l'endocytose d'acide nucléique in vitro (contrairement aux modèles in vivo) aboutit fréquemment à ce type de phénomène (Juliano, 2018). Pour explorer cette possibilité, nous avons utilisé l'UNC7938. Ce dernier est un composé connu pour permettre la libération des oligonucléotides de l'endosome tardif in vitro (Blanchet et al., 2019a; Juliano, 2018; Yang et al., 2015a). Il a été utilisé in vitro pour permettre aux oligonucléotides (comme les antisens et les siARN) d'atteindre leur cible intracellulaire, et d'exercer un effet biologique. Nous avons de fait exploité l'UNC7938 dans la perspective de libérer l'ARN viral possiblement présent dans les cellules cibles. Nos résultats suggèrent effectivement une amplification d'ARN viral dans les cellules naïves Huh7 qui ont été mises en culture avec les exosomes issus des cellules exprimant le VHD (sans VHB). Ceci suggère que les exosomes sont capables de transmettre l'infection à des cellules naïves. Nos résultats sont intéressants toutefois il est important de mentionner qu'ils sont produits dans un modèle expérimental bien spécifique (utilisation d'UNC7938) et qui peuvent être non applicables dans un modèle in vivo. De plus, des analyses supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si le VHD se réplique dans les cellules naïves qui reçoivent les exosomes « infectieux ». Cette possibilité pourrait être testée par immunobuvardage de type western en évaluant l'expression des protéines S-AgHD et spécifiquement L-AgHD (indicateur de réplication du génome delta) dans les cellules naïves hépatiques en incubation avec les exosomes spécifiques au VHD. Il est aussi possible d'évaluer, par microscopie confocale, la localisation nucléaire de l'AgHD dans des cellules incubées avec les exosomes spécifiques au VHD. Nous pouvons constater que toutes les observations ont été réalisées dans la lignée cellulaire Huh7, il serait donc intéressant de valider ces observations dans une autre lignée cellulaire hépatique telle que HepG2 parce que le métabolisme lipidique entre ces lignées d'hépatocytes est diffèrent (Gunn et al., 2017).

Il a été montré que différents virus hépatiques exploitent les exosomes pour différents objectifs. Par exemple, le VHE et le VHA utilisent la voie exosomale pour acquérir une enveloppe qui leur permet d'échapper au système immunitaire (Feng *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2017; Nagashima *et al.*, 2014). Le VHB et le VHC exploitent également les exosomes pour transmettre l'infection entre les cellules hépatiques (Ramakrishnaiah *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2018). Ainsi, nous pouvons nous interroger sur les raisons de la présence des composantes virales du VHD dans les exosomes ainsi que sur leur effet sur l'augmentation de la sécrétion des exosomes dans la cellule. Des analyses supplémentaires seront nécessaires pour répondre à ces interrogations. Cependant, différents éléments dans la littérature peuvent nous guider pour développer quelques hypothèses. D'abord, l'exploitation de la voie endosomale par le VHD pourrait être une stratégie pour s'échapper du système immunitaire. Ainsi, le VHD pourrait échapper à la neutralisation une fois dans les exosomes (Chapuy-Regaud *et al.*, 2017; Ramakrishnaiah *et al.*, 2013). La présence du VHD dans les exosomes pourrait également être un moyen de persistance virale étant donné qu'il a été montré que le VHD peut persister dans les cellules durant des semaines en absence du VHB, et durant des mois après une transplantation du foie (Giersch *et al.*, 2019).

Il est évident que la co-infection et la surinfection par le VHD aggravent la maladie et accélèrent l'évolution vers la cirrhose, la fibrose et le cancer du foie. Cependant, la cause de cette accélération n'est pas bien définie. Par ailleurs, il a été montré que les exosomes issues des hépatocytes infectées par le VHC stimulent les cellules stellaires hépatiques, induisent l'expression de différents marqueurs profibrotiques et favorisent donc la fibrose de foie (Devhare *et al.*, 2017). D'autre part, les exosomes sont aussi impliqués dans la pathogenèse de maladies du foie dues à l'alcool (Rahman *et al.*, 2019). Ainsi, les patients atteints de ces maladies ont un nombre élevé d'exosomes dans le sang (Momen-Heravi *et al.*, 2015). En présence d'alcool, les exosomes dans le sang des souris sont enrichies en miARNs pro-inflammatoires (exemple miR-122) (Momen-Heravi *et al.*, 2015). Par analogie à ces études, les exosomes pourraient contribuer à la pathogenèse induite par le VHD telle que la fibrose de foie. Cette possibilité devrait être évaluée dans des études ultérieures.

De plus, il a été montré que le VHD exploite d'autres virus enveloppés autre que le VHB pour compléter son cycle de réplication et pour se transmettre entre les cellules (Perez-Vargas *et al.*, 2019). Ceci signifie que nous ne pouvons pas éliminer la possibilité que le VHD puisse également être transmis à travers les exosomes, et que la transmission de l'infection du VHD pourrait être, du moins en partie, indépendante du VHB.

Pendant la rédaction de ma thèse, une première étude sur les vésicules extracellulaires et le VHD a été réalisée (Jung et al., 2020). Cette étude a montré que l'infection par le VHD induit une augmentation de la production de vésicules extracellulaires. Ces dernières sont des intermédiaires pour la réponse pro-inflammatoire des cytokines (TNF- α , IFN- γ , IL-6) dans les cellules primaires humaines immunitaires (PBMC et macrophage) (Jung et al., 2020). De même, les exosomes issues des cellules infectées par le VHB modulent la réponse immunitaire lors de l'infection (Li et al., 2019). Des investigations supplémentaires devront être réalisées pour déterminer l'impact des exosomes contenant le VHD sur la réponse immunitaire innée dans notre modèle cellulaire. Il conviendrait d'incuber les PBMC et les macrophages avec des exosomes spécifiques au VHD et de quantifier, par cytométrie en flux les cytokines pro-inflammatoires (par exemple IL-6, IL-12) et/ou les Interférons de Type I. Il serait également intéressant de comparer la composition protéique des exosomes spécifiques au VHD par rapport aux exosomes des cellules hépatiques naïves. Il conviendrait d'exposer des cultures d'HepG2.2.15 à des exosomes spécifiques au VHD et d'évaluer leur capacité à produire des virions VHD infectieux. Il serait aussi intéressant de quantifier les exosomes dans le sérum des patients co-infecté par VHB et VHD et de comparer leur composition par rapport aux exosomes des individus sains. Cette proposition aura une difficulté qui consiste en la séparation des exosomes des virions matures, mais elle pourra être contournée par une étape additionnelle d'immunoprécipitation d'exosomes avec un anticorps anti-CD63 ou des virions matures avec un anticorps anti Pré-S par exemple. Enfin, il serait complexe, mais intéressant de travailler avec un modèle in vivo (exprimant le VHD et le VHB) qui serait un atout considérable pour obtenir des données plus physiologiques. Notons que les modèles in vivo de co-infection VHD / VHB sont très limités (Burwitz et al., 2020; Lempp & Urban, 2017). En effet le seul modèle animal naturel approuvé par les comités d'éthique supportant la réplication du VHD est celui de la marmotte (Ponzetto et al., 1984). Le modèle des souris au foie humanisé (Lempp & Urban, 2017) pourrait être exploité sauf qu'une limitation majeure se présente qui consiste en une sensibilité au VHB très variable et généralement très faible (Burwitz et al., 2020).

13 Modèle proposé

Nous proposons dans la Figure 4.3 un modèle qui réunit les deux études (autophagie/VHD et sécrétion d'exosomes/VHD) présentées dans ce manuscrit et il décrit comment l'autophagie et la sécrétion d'exosomes favoriserait la propagation du VHD indépendamment du VHB. Le VHD est capable d'activer l'autophagie qui en retour favorise la réplication de son génome (Khabir *et al.*, 2020). Dans le contexte d'une co-infection cette capacité du VHD à activer l'autophagie a un

intérêt limité puisque le VHB active déjà l'autophagie. Cependant une nuance importante a été documenté sur la capacité du VHD à réprimer la réplication du VHB (Huang & Lo, 2014). Il peut donc être intéressant pour le VHD d'assurer un certain niveau d'autophagie au cas où le VHB ne serait plus en mesure de le faire. Cependant, dans l'état actuel de nos travaux, certaines spéculations très intéressantes peuvent être tirées. D'une part, le VHD active l'autophagie qui a son tour favorise la réplication du génome du VHD. D'autre part, Les composantes du VHD semblent pouvoir être transmis à des cellules naïves en absence du VHB. Par conséquence, Il se pourrait que le VHD puisse se répliquer (et former une RNP) dans les cellules ciblées par les exosomes. Nous pouvons émettre l'hypothèse que si le VHB est absent dans des cellules infectées par le VHD sous forme d'exosome, le fait que le VHD active l'autophagie devient très important puisque celle-ci favorise l'étape de réplication de l'ARN du VHD (qui elle-même est indépendante du VHB), et possiblement la synthèse de RNP.



Figure 4.3: L'autophagie et la sécrétion d'exosomes favoriserait la propagation du VHD indépendamment du VHB

Le VHD et ces composantes (S-AgHD et L-AgHD) activent l'autophagie dans la cellule hépatique. Les facteurs autophagiques (ATG5, ATG7 et possiblement LC3) favorisent à son tour la réplication du VHD. De plus, l'AgHD (S-AgHD et L-AgHD) seul ou en association avec la RNP provoquent l'augmentation de la sécrétion d'exosomes. Ces derniers sont chargés avec les composantes virale du VHD et ils sont internalisés par la cellule hépatique voisine ou distante receveuse. Les exosomes transfèrent l'AgHD et l'ARN viral du VHD dans la cellule cible qui n'exprime pas le VHB en présence d'UNC7938. Le VHD pourrait se répliquer dans la cellule receveuse. Ces composantes virales activent l'autophagie qui favorise la réplication du VHD, possiblement la synthèse de la RNP, indépendamment du VHB.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En réponse à un stress cellulaire, par exemple dans le cas d'une infection virale, la cellule induit différents mécanismes afin de rétablir son homéostasie. L'autophagie et la sécrétion des exosomes sont deux exemples différents de ces mécanismes.

L'ensemble des travaux présentés dans cette thèse nous a permis d'évaluer l'effet de la mono-expression et co-expression du VHD et du VHB sur le processus autophagique ainsi que l'implication de l'autophagie lors du cycle de réplication des deux virus. Nos études ont également permis de découvrir que la réplication du VHD, en absence du VHB, augmente la sécrétion des exosomes spécifiques au VHD.

Durant la première partie de la thèse, nous avons tout d'abord démontré dans notre modèle cellulaire que le VHB induit l'autophagie par deux de ses composantes virales, la HBx et la S-AgHBs, mais il bloque le flux autophagique. De plus, nous avons montré que la machinerie autophagique est nécessaire pour la sécrétion/maturation des virions du VHB. Il serait intéressant d'approfondir les connaissances concernant les mécanismes d'interaction entre le VHB et l'autophagie. Par exemple, en étudiant l'interaction et la colocalisation entre les protéines autophagiques (LC3, ATG5, ATG12, ATG16...) et les protéines virales (S-AgHBs et HBx) en utilisant des techniques disponibles dans notre laboratoire telles que la PLA « *Proximity Ligation Essay* » et l'immunofluorescence à l'aide de la microscopie confocale.

Ensuite, nous avons montré que la S-AgHD et la L-AgHD induisent l'autophagie, mais qu'elles en bloquent le flux. De plus, nos résultats ont permis de montrer qu'ATG5 est un facteur proviral pour la réplication de l'ARN du VHD. La machinerie autophagique (ATG5, ATG7 et LC3) semble être impliquée lors du cycle de réplication des deux virus également en cas de coexpression de VHB et VHD. Il serait important de déterminer le mécanisme d'interaction entre l'autophagie et la réplication du VHD. Il serait possible d'étudier l'effet de la présence du VHD dans la cellule sur l'initiation de processus autophagique en évaluant par exemple l'expression de la protéine Bécline 1 par immunobuvardage de type western. Il serait également intéressant d'évaluer l'activation de l'autophagie par le VHD à travers la réponse UPR en évaluant l'expression protéique et génique de trois médiateurs de la réponse UPR (ATF6, PERK et IRE-1). De plus, une étude de l'interaction et la localisation des protéines autophagiques par rapport aux protéines delta, permettra de mieux comprendre l'effet proviral de l'autophagie sur le VHD. Nous privilégierons l'analyse de l'interaction entre l'ATG16L1 et l'AgHD en reproduisant les résultats, mentionnées dans la Figure 4.2, et en effectuant de la PLA pour évaluer la proximité de deux protéines dans la cellule. De plus, il serait possible dans notre laboratoire de produire des lignées « knockout » pour ATG16L1 par la technologie CRISPR-Cas9. Ainsi, il serait intéressant

de réévaluer la localisation de l'ATG16L1 par rapport l'AgHD dans les cellules « *knockout* » pour ATG16L1, mais exprimant le VHD par immunofluorescence et microscopie confocale. Il est également possible d'évaluer l'effet de l'inhibition de l'expression d'ATG16 sur la réplication du VHD, la sécrétion des virions du VHD extracellulaires et l'expression des isoformes delta (S-AgHD et L-AgHD) par RT-qPCR et immunobuvardage de type western respectivement. Il est également intéressant d'étudier l'interaction entre la protéine HuR, l'AgHD et l'ATG16L1 par immunoprécipitation, immunofluorescence et microscopie confocale et PLA. Il est aussi possible de produire des cellules double « *knockout* » pour ATG16L1 et HuR et d'évaluer la réplication du VHD, la sécrétion des virons du VHD extracellulaires et l'expression des isoformes delta (S-AgHD) par RT-qPCR et immunoprécipitation entre la protéine HuR, l'AgHD et l'ATG16L1 par immunoprécipitation, immunofluorescence et microscopie confocale et PLA. Il est aussi possible de produire des cellules double « *knockout* » pour ATG16L1 et HuR et d'évaluer la réplication du VHD, la sécrétion des virons du VHD extracellulaires et l'expression des isoformes delta (S-AgHD et L-AgHD) par RT-qPCR et immunobuvardage de type western respectivement.

Dans la deuxième partie de la thèse, nous avons dans un premier temps observé que l'AgHD se propage entre les cellules *in vitro*. Par la suite, nous avons montré que l'expression de la RNP augmente la sécrétion des vésicules extracellulaires, y compris les exosomes. De plus, nous avons démontré que les exosomes isolés dans les surnageants des cellules exprimant la RNP du VHD, contiennent l'AgHD. Finalement, nous avons constaté que les cellules naïves mises en conctact avec les exosomes isolés des cellules exprimant la RNP du VHD, semblent amplifier l'ARN viral du VHD. Cependant des analyses supplémentaires seront nécessaires pour démontrer que les cellules inoculées avec des exosomes spécifiques au VHD permettent la propagation et la réplication complète du VHD en absence du VHB.

Il serait intéressant de déterminer l'effet de la présence des composantes du VHD dans les exosomes sur la pathogenèse et la réponse immunitaire innée. Nous proposons d'incuber les exosomes spécifiques du VHD avec les cellules stellaires hépatiques naïves, qui jouent un rôle important dans la fibrose hépatique, ensuite de procéder à quantifier par cyrtométrie en flux ou RT-qPCR les facteurs profibrotiques par exemple TGF- β « *transforming growth factor* β ». Nous suggérons de mettre en culture les exosomes spécifiques au VHD avec des cellules immunitaires et de quantifier par cytométrie en flux les cytokines pro-inflammatoires et/ou Interférons type 1. Il serait également intéressant d'exposer des cultures d'HepG2.2.15 à des exosomes spécifiques au VHD et d'évaluer leur capacité à produire des virions VHD infectieux.

Notre étude est la première à montrer le lien entre l'autophagie et le VHD, non seulement en cas de mono-expression, mais également dans le cadre de co-expression avec le VHB. De plus, nous sommes les premiers à montrer l'effet de la réplication du VHD sur la sécrétion deexosomes spécifiques au VHD. Ces études sont importantes pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, car les traitements actuels pour le VHB ne sont pas efficaces pour le VHD. De

plus, les exosomes pourraient être utilisés comme des biomarqueurs de diagnostic d'infection par le VHD. Ainsi, pronostiquer la progression vers les pathologies associées au VHD (exemples fibrose ou cancer du foie) en fonction non seulement de l'élévation du taux de sécrétion d'exosomes mais aussi de différences dans la composition d'exosomes entre les patients infectés et non infectés.

Liste des Référence Bibliographiques

- Abbas Z & Afzal R (2013) Life cycle and pathogenesis of hepatitis D virus: A review. *World J. Hepatol.* 5(12):666-675.
- Abeywickrama-Samarakoon N, Cortay JC, Sureau C, Alfaiate D, Levrero M & Deny P (2018) [Hepatitis delta virus replication and the role of the small hepatitis delta protein S-HDAg]. *Med. Sci. (Paris)* 34(10):833-841.
- Abeywickrama-Samarakoon N, Cortay JC, Sureau C, Muller S, Alfaiate D, Guerrieri F, Chaikuad A, Schroder M, Merle P, Levrero M & Deny P (2020) Hepatitis Delta Virus histone mimicry drives the recruitment of chromatin remodelers for viral RNA replication. *Nat Commun* 11(1):419.
- Abou-Jaoudé G & Sureau C (2007) Entry of hepatitis delta virus requires the conserved cysteine residues of the hepatitis B virus envelope protein antigenic loop and is blocked by inhibitors of thiol-disulfide exchange. *J. Virol.* 81(23):13057-13066.
- Abreu S, Sanchez-Wandelmer J & Reggiori F (2013) The Origin of Autophagosomes: The Beginning of an End. *Autophagy and Cancer*, 10.1007/978-1-4614-6561-4_3. p 47-61.
- Abudoureyimu M, Zhou H, Zhi Y, Wang T, Feng B, Wang R & Chu X (2019) Recent progress in the emerging role of exosome in hepatocellular carcinoma. *Cell Prolif.* 52(2):e12541.
- Ahat E, Li J & Wang Y (2019) New Insights Into the Golgi Stacking Proteins. *Front Cell Dev Biol* 7:131.
- Ahmad L, Mostowy S & Sancho-Shimizu V (2018) Autophagy-Virus Interplay: From Cell Biology to Human Disease. *Front Cell Dev Biol* 6:155.
- Ait-Goughoulte M, Kanda T, Meyer K, Ryerse JS, Ray RB & Ray R (2008) Hepatitis C virus genotype 1a growth and induction of autophagy. *J. Virol.* 82(5):2241-2249.
- Al-Sadeq DW, Taleb SA, Zaied RE, Fahad SM, Smatti MK, Rizeq BR, Al Thani AA, Yassine HM
 & Nasrallah GK (2019) Hepatitis B Virus Molecular Epidemiology, Host-Virus Interaction, Coinfection, and Laboratory Diagnosis in the MENA Region: An Update. *Pathogens* 8(2).
- Allen J, Najjar K, Erazo-Oliveras A, Kondow-McConaghy HM, Brock DJ, Graham K, Hager EC, Marschall ALJ, Dubel S, Juliano RL & Pellois JP (2019) Cytosolic Delivery of Macromolecules in Live Human Cells Using the Combined Endosomal Escape Activities of a Small Molecule and Cell Penetrating Peptides. ACS Chem. Biol. 14(12):2641-2651.
- Allweiss L & Dandri M (2016) Experimental in vitro and in vivo models for the study of human hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 64(1 Suppl):S17-S31.
- Alves C, Cheng H, Roder H & Taylor J (2010) Intrinsic disorder and oligomerization of the hepatitis delta virus antigen. *Virology* 407(2):333-340.
- Angélique B (2012) Rôle des protéines Rab27 dans la sécrétion des exosomes :
- implication dans l'étude des réponses immunitaires tumorales Doctorat (Paris-Descartes).
- Antonucci TK & Rutter WJ (1989) Hepatitis B virus (HBV) promoters are regulated by the HBV enhancer in a tissue-specific manner. *J. Virol.* 63(2):579-583.
- Arias E & Cuervo AM (2011) Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23(2):184-189.

- Bagga S, Rawat S, Ajenjo M & Bouchard MJ (2016) Hepatitis B virus (HBV) X protein-mediated regulation of hepatocyte metabolic pathways affects viral replication. *Virology* 498:9-22.
- Bartenschlager R & Schaller H (1988) The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription. *EMBO J.* 7(13):4185-4192.
- Bartenschlager R & Schaller H (1993) Mechanisms governing hepadnaviral nucleocapsid assembly. *J. Hepatol.* 17 Suppl 3:S15-19.
- Barth S, Glick D & Macleod KF (2010) Autophagy: assays and artifacts. *J. Pathol.* 221(2):117-124.
- Bazinet M, Pântea V, Cebotarescu V, Cojuhari L, Jimbei P, Albrecht J, Schmid P, Le Gal F, Gordien E, Krawczyk A, Mijočević H, Karimzadeh H, Roggendorf M & Vaillant A (2017) Safety and efficacy of REP 2139 and pegylated interferon alfa-2a for treatment-naive patients with chronic hepatitis B virus and hepatitis D virus co-infection (REP 301 and REP 301-LTF): a non-randomised, open-label, phase 2 trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2(12):877-889.
- Bazinet M, Pântea V, Placinta G, Moscalu I, Cebotarescu V, Cojuhari L, Jimbei P, Iarovoi L, Smesnoi V, Musteata T, Jucov A, Dittmer U, Krawczyk A & Vaillant A (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):2180-2194.
- Beale R, Wise H, Stuart A, Ravenhill BJ, Digard P & Randow F (2014) A LC3-interacting motif in the influenza A virus M2 protein is required to subvert autophagy and maintain virion stability. *Cell Host Microbe* 15(2):239-247.
- Beasley RP (1988) Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 61(10):1942-1956.
- Beilstein F, Blanchet M, Vaillant A & Sureau C (2018) Nucleic Acid Polymers Are Active against Hepatitis Delta Virus Infection In Vitro. *J. Virol.* 92(4).
- Bichko VV, Khudyakov YE & Taylor JM (1996) A novel form of hepatitis delta antigen. *J. Virol.* 70(5):3248-3251.
- Bichko VV & Taylor JM (1996) Redistribution of the delta antigens in cells replicating the genome of hepatitis delta virus. *J. Virol.* 70(11):8064-8070.
- Billet O, Grimber G, Levrero M, Seye KA, Briand P & Joulin V (1995) In vivo activity of the hepatitis B virus core promoter: tissue specificity and temporal regulation. *J. Virol.* 69(9):5912-5916.
- Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H & Johansen T (2005) p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell Biol.* 171(4):603-614.
- Blanchet M (2007) Etude du déterminisme de maturation et d'infectiosité des Virus des Hépatites B et Delta. PhD (Université Paris 7 – Denis Diderot).
- Blanchet M, Sinnathamby V, Vaillant A & Labonte P (2019a) Inhibition of HBsAg secretion by nucleic acid polymers in HepG2.2.15cells. *Antiviral Res* 164:97-105.
- Blanchet M, Sinnathamby V, Vaillant A & Labonté P (2019b) Inhibition of HBsAg secretion by nucleic acid polymers in HepG2.2.15 cells. *Antiviral Res.* 164:97-105.

- Blanchet M & Sureau C (2007) Infectivity determinants of the hepatitis B virus pre-S domain are confined to the N-terminal 75 amino acid residues. *J. Virol.* 81(11):5841-5849.
- Blumberg BS (1977) Australia antigen and the biology of hepatitis B. Science 197(4298):17-25.
- Blumberg BS, Melartin L, Guint RA & Werner B (1966) Family studies of a human serum isoantigen system (Australia antigen). *Am. J. Hum. Genet.* 18(6):594-608.
- Bock CT, Schranz P, Schröder CH & Zentgraf H (1994) Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell. *Virus Genes* 8(3):215-229.
- Bock CT, Schwinn S, Locarnini S, Fyfe J, Manns MP, Trautwein C & Zentgraf H (2001) Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome. *J. Mol. Biol.* 307(1):183-196.
- Bogomolov P, Alexandrov A, Voronkova N, Macievich M, Kokina K, Petrachenkova M, Lehr T, Lempp FA, Wedemeyer H, Haag M, Schwab M, Haefeli WE, Blank A & Urban S (2016) Treatment of chronic hepatitis D with the entry inhibitor myrcludex B: First results of a phase lb/lla study. *J. Hepatol.* 65(3):490-498.
- Bonino F, Heermann KH, Rizzetto M & Gerlich WH (1986) Hepatitis delta virus: protein composition of delta antigen and its hepatitis B virus-derived envelope. *J. Virol.* 58(3):945-950.
- Bordier BB, Marion PL, Ohashi K, Kay MA, Greenberg HB, Casey JL & Glenn JS (2002) A prenylation inhibitor prevents production of infectious hepatitis delta virus particles. *J. Virol.* 76(20):10465-10472.
- Bosch V, Bartenschlager R, Radziwill G & Schaller H (1988) The duck hepatitis B virus P-gene codes for protein strongly associated with the 5'-end of the viral DNA minus strand. *Virology* 166(2):475-485.
- Botelho-Souza LF, Vasconcelos MPA, Dos Santos AO, Salcedo JMV & Vieira DS (2017) Hepatitis delta: virological and clinical aspects. *Virol J.* 14(1):177.
- Bouchard MJ & Schneider RJ (2004) The enigmatic X gene of hepatitis B virus. J. Virol. 78(23):12725-12734.
- Branch A, Levine B & Robertson H (1990) The brotherhood of circular RNA pathogens: viroids, circular satellites, and the delta agent. *Semin. Virol.* 1:143-152.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA & Jemal A (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 68(6):394-424.
- Brazas R & Ganem D (1996) A cellular homolog of hepatitis delta antigen: implications for viral replication and evolution. *Science* 274(5284):90-94.
- Bruss V (1997) A short linear sequence in the pre-S domain of the large hepatitis B virus envelope protein required for virion formation. *J. Virol.* 71(12):9350-9357.
- Bruss V (2004) Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. Virus Res. 106:199–209.
- Bruss V (2007) Hepatitis B virus morphogenesis. World J. Gastroenterol. 13(1):65-73.
- Bruss V & Ganem D (1991) The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88(3):1059-1063.
- Bruss V, Hagelstein J, Gerhardt E & Galle PR (1996) Myristylation of the large surface protein is required for hepatitis B virus in vitro infectivity. *Virology* 218(2):396-399.

- Bruss V, Lu X, Thomssen R & Gerlich WH (1994) Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein. *EMBO J.* 13(10):2273-2279.
- Bruss V & Thomssen R (1994) Mapping a region of the large envelope protein required for hepatitis B virion maturation. *J. Virol.* 68(3):1643-1650.
- Budzinska MA, Shackel NA, Urban S & Tu T (2018) Cellular Genomic Sites of Hepatitis B Virus DNA Integration. *Genes (Basel)* 9(7).
- Bukong TN, Momen-Heravi F, Kodys K, Bala S & Szabo G (2014) Exosomes from hepatitis C infected patients transmit HCV infection and contain replication competent viral RNA in complex with Ago2-miR122-HSP90. *PLoS Pathog.* 10(10):e1004424.
- Burwitz BJ, Zhou Z & Li W (2020) Animal models for the study of human hepatitis B and D virus infection: New insights and progress. *Antiviral Res.* 182:104898.
- Cao D, Haussecker D, Huang Y & Kay MA (2009) Combined proteomic-RNAi screen for host factors involved in human hepatitis delta virus replication. *RNA* 15(11):1971-1979.
- Carpenter JE, Jackson W, Benetti L & Grose C (2011) Autophagosome formation during varicellazoster virus infection following endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. *J. Virol.* 85(18):9414-9424.
- Casaca A, Fardilha M, da Cruz ESE & Cunha C (2011) In Vivo Interaction of the Hepatitis Delta Virus Small Antigen with the ELAV-Like Protein HuR. *Open Virol. J.* 5:12-21.
- Casey JL (2012) Control of ADAR1 editing of hepatitis delta virus RNAs. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 353:123-143.
- Casey JL, Bergmann KF, Brown TL & Gerin JL (1992) Structural requirements for RNA editing in hepatitis delta virus: evidence for a uridine-to-cytidine editing mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89(15):7149-7153.
- Casey JL & Gerin JL (1995) Hepatitis D virus RNA editing: specific modification of adenosine in the antigenomic RNA. *J. Virol.* 69(12):7593-7600.
- Chai N, Chang HE, Nicolas E, Han Z, Jarnik M & Taylor J (2008) Properties of subviral particles of hepatitis B virus. *J. Virol.* 82(16):7812-7817.
- Chan BD, Wong WY, Lee MML, Cho WCS, Yee BK, Kwan YW & Tai WCS (2019) Exosomes in inflammation and inflammatory disease. *Proteomics* 19(8):1800149.
- Chang FL, Chen PJ, Tu SJ, Wang CJ & Chen DS (1991) The large form of hepatitis delta antigen is crucial for assembly of hepatitis delta virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88(19):8490-8494.
- Chang J, Gudima SO, Tarn C, Nie X & Taylor JM (2005) Development of a novel system to study hepatitis delta virus genome replication. *J. Virol.* 79(13):8182-8188.
- Chang J, Nie X, Chang HE, Han Z & Taylor J (2008) Transcription of hepatitis delta virus RNA by RNA polymerase II. *J. Virol.* 82(3):1118-1127.
- Chao M, Hsieh SY & Taylor J (1990) Role of two forms of hepatitis delta virus antigen: evidence for a mechanism of self-limiting genome replication. *J. Virol.* 64(10):5066-5069.
- Chapuy-Regaud S, Dubois M, Plisson-Chastang C, Bonnefois T, Lhomme S, Bertrand-Michel J, You B, Simoneau S, Gleizes PE, Flan B, Abravanel F & Izopet J (2017) Characterization of the lipid envelope of exosome encapsulated HEV particles protected from the immune response. *Biochimie* 141:70-79.

- Charnay P, Pourcel C, Louise A, Fritsch A & Tiollais P (1979) Cloning in Escherichia coli and physical structure of hepatitis B virion DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76(5):2222-2226.
- Chaturvedi VK, Singh A, Dubey SK, Hetta HF, John J & Singh MP (2019) Molecular mechanistic insight of hepatitis B virus mediated hepatocellular carcinoma. *Microb. Pathog.* 128:184-194.
- Chaumorcel M, Lussignol M, Mouna L, Cavignac Y, Fahie K, Cotte-Laffitte J, Geballe A, Brune W, Beau I, Codogno P & Esclatine A (2012) The human cytomegalovirus protein TRS1 inhibits autophagy via its interaction with Beclin 1. *J. Virol.* 86(5):2571-2584.
- Chen L, Chen R, Kemper S & Brigstock DR (2018) Pathways of production and delivery of hepatocyte exosomes. *J Cell Commun Signal* 12(1):343-357.
- Chen M, Du D, Zheng W, Liao M, Zhang L, Liang G & Gong M (2019) Small hepatitis delta antigen selectively binds to target mRNA in hepatic cells: a potential mechanism by which hepatitis D virus downregulates glutathione S-transferase P1 and induces liver injury and hepatocarcinogenesis. *Biochem. Cell Biol.* 97(2):130-139.
- Chen PJ, Kalpana G, Goldberg J, Mason W, Werner B, Gerin J & Taylor J (1986) Structure and replication of the genome of the hepatitis delta virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83(22):8774-8778.
- Cheng H, Zhang HZ, Shen WA, Liu YF & Ma FC (2003a) Expression of RNase H of human hepatitis B virus polymerase in Escherichia coli. *World J. Gastroenterol.* 9(3):513-515.
- Cheng Q, Jayan GC & Casey JL (2003b) Differential Inhibition of RNA Editing in Hepatitis Delta Virus Genotype III by the Short and Long Forms of Hepatitis Delta Antigen. *J. Virol.* 77(14):7786-7795.
- Choi Y, Bowman JW & Jung JU (2018) Autophagy during viral infection a double-edged sword. *Nat. Rev. Microbiol.* 16(6):341-354.
- Chou HC, Hsieh TY, Sheu GT & Lai MM (1998) Hepatitis delta antigen mediates the nuclear import of hepatitis delta virus RNA. *J. Virol.* 72(5):3684-3690.
- Chou YC, Jeng KS, Chen ML, Liu HH, Liu TL, Chen YL, Liu YC, Hu CP & Chang C (2005) Evaluation of transcriptional efficiency of hepatitis B virus covalently closed circular DNA by reverse transcription-PCR combined with the restriction enzyme digestion method. *J. Virol.* 79(3):1813-1823.
- Ciani B, Layfield R, Cavey JR, Sheppard PW & Searle MS (2003) Structure of the ubiquitinassociated domain of p62 (SQSTM1) and implications for mutations that cause Paget's disease of bone. J. Biol. Chem. 278(39):37409-37412.
- Clark DN & Hu J (2015) Unveiling the roles of HBV polymerase for new antiviral strategies. *Future Virol.* 10(3):283-295.
- Codogno P, Mehrpour M & Proikas-Cezanne T (2011) Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13(1):7-12.
- Coffin CS, Fung SK, Alvarez F, Cooper CL, Doucette KE, Fournier C, Kelly E, Ko HH, Ma MM, Martin SR, Osiowy C, Ramji A, Tam E & Villeneuve JP (2018) Management of Hepatitis B Virus Infection: 2018 Guidelines from the Canadian Association for the Study of the Liver and Association of Medical Microbiology and Infectious Disease Canada. *Canadian Liver Journal* 1(4):156-217.

- Cole SM, Gowans EJ, Macnaughton TB, Hall PD & Burrell CJ (1991) Direct evidence for cytotoxicity associated with expression of hepatitis delta virus antigen. *Hepatology* 13(5):845-851.
- Conde-Vancells J, Rodriguez-Suarez E, Embade N, Gil D, Matthiesen R, Valle M, Elortza F, Lu SC, Mato JM & Falcon-Perez JM (2008) Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *J. Proteome Res.* 7(12):5157-5166.
- Cooksley WG, Piratvisuth T, Lee SD, Mahachai V, Chao YC, Tanwandee T, Chutaputti A, Chang WY, Zahm FE & Pluck N (2003) Peginterferon alpha-2a (40 kDa): an advance in the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *J. Viral Hepat.* 10(4):298-305.
- Cornillez-Ty CT & Lazinski DW (2003) Determination of the multimerization state of the hepatitis delta virus antigens in vivo. *J. Virol.* 77(19):10314-10326.
- Corona AK, Saulsbery HM, Corona Velazquez AF & Jackson WT (2018) Enteroviruses Remodel Autophagic Trafficking through Regulation of Host SNARE Proteins to Promote Virus Replication and Cell Exit. *Cell Rep.* 22(12):3304-3314.
- Dandri M & Peterson J (2018) HVB virology. *Hepatology: a clinical textbook*, Mauss S, Berg T, Rockstroh J, Sarrazin C & Wedemeyer H (Édit.) Praxis, Düsseldorf, Germany, 9th Ed. p 87-108.
- Dane DS, Cameron CH & Briggs M (1970) Virus-like particles in serum of patients with Australiaantigen-associated hepatitis. *Lancet* 1(7649):695-698.
- Delage G & Carter AO (1992) Hepatitis B Infection in Canada: Epidemiology and implications for control. *Can. Fam. Physician* 38:2656-2666.
- Delius H, Gough NM, Cameron CH & Murray K (1983) Structure of the hepatitis B virus genome. *J. Virol.* 47(2):337-343.
- Delneste Y, Beauvillain C & Jeannin P (2007) [Innate immunity: structure and function of TLRs]. *Med. Sci. (Paris)* 23(1):67-73.
- Delpeut S, Rudd PA, Labonte P & von Messling V (2012) Membrane fusion-mediated autophagy induction enhances morbillivirus cell-to-cell spread. *J. Virol.* 86(16):8527-8535.
- Desdin-Mico G & Mittelbrunn M (2017) Role of exosomes in the protection of cellular homeostasis. *Cell Adh Migr* 11(2):127-134.
- Devhare PB, Sasaki R, Shrivastava S, Di Bisceglie AM, Ray R & Ray RB (2017) Exosome-Mediated Intercellular Communication between Hepatitis C Virus-Infected Hepatocytes and Hepatic Stellate Cells. *J. Virol.* 91(6).
- Ding B, Zhang G, Yang X, Zhang S, Chen L, Yan Q, Xu M, Banerjee AK & Chen M (2014) Phosphoprotein of human parainfluenza virus type 3 blocks autophagosome-lysosome fusion to increase virus production. *Cell Host Microbe* 15(5):564-577.
- Ding WX & Yin XM (2012) Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol. Chem.* 393(7):547-564.
- Doring T & Prange R (2015) Rab33B and its autophagic Atg5/12/16L1 effector assist in hepatitis B virus naked capsid formation and release. *Cell. Microbiol.* 17(5):747-764.
- Doring T, Zeyen L, Bartusch C & Prange R (2018) Hepatitis B Virus Subverts the Autophagy Elongation Complex Atg5-12/16L1 and Does Not Require Atg8/LC3 Lipidation for Viral Maturation. *J. Virol.* 92(7).

- Dreux M, Garaigorta U, Boyd B, Decembre E, Chung J, Whitten-Bauer C, Wieland S & Chisari FV (2012) Short-range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity. *Cell Host Microbe* 12(4):558-570.
- Dreux M, Gastaminza P, Wieland SF & Chisari FV (2009) The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106(33):14046-14051.
- Drexler JF, Geipel A, Konig A, Corman VM, van Riel D, Leijten LM, Bremer CM, Rasche A, Cottontail VM, Maganga GD, Schlegel M, Muller MA, Adam A, Klose SM, Carneiro AJ, Stocker A, Franke CR, Gloza-Rausch F, Geyer J, Annan A, Adu-Sarkodie Y, Oppong S, Binger T, Vallo P, Tschapka M, Ulrich RG, Gerlich WH, Leroy E, Kuiken T, Glebe D & Drosten C (2013) Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110(40):16151-16156.
- Dubois MF, Pourcel C, Rousset S, Chany C & Tiollais P (1980) Excretion of hepatitis B surface antigen particles from mouse cells transformed with cloned viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77(8):4549-4553.
- Eble BE, Lingappa VR & Ganem D (1986) Hepatitis B surface antigen: an unusual secreted protein initially synthesized as a transmembrane polypeptide. *Mol. Cell. Biol.* 6(5):1454-1463.
- Eble BE, Lingappa VR & Ganem D (1990) The N-terminal (pre-S2) domain of a hepatitis B virus surface glycoprotein is translocated across membranes by downstream signal sequences. *J. Virol.* 64(3):1414-1419.
- Edgar JR (2016) Q&A: What are exosomes, exactly? BMC Biol. 14:46.
- English L, Chemali M, Duron J, Rondeau C, Laplante A, Gingras D, Alexander D, Leib D, Norbury C, Lippe R & Desjardins M (2009) Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nat. Immunol.* 10(5):480-487.
- Erhardt A, Gerlich W, Starke C, Wend U, Donner A, Sagir A, Heintges T & Häussinger D (2006) Treatment of chronic hepatitis delta with pegylated interferon-α2b. *Liver International* 26(7):805-810.
- Eskelinen EL (2008) To be or not to be? Examples of incorrect identification of autophagic compartments in conventional transmission electron microscopy of mammalian cells. *Autophagy* 4(2):257-260.
- Essandoh K, Yang L, Wang X, Huang W, Qin D, Hao J, Wang Y, Zingarelli B, Peng T & Fan GC (2015) Blockade of exosome generation with GW4869 dampens the sepsis-induced inflammation and cardiac dysfunction. *Biochim. Biophys. Acta* 1852(11):2362-2371.
- Etzion O, Hamid S, Lurie Y, Gane E, Bader N, Yardeni D, Nevo-Shor A, Channa S, Mawani M & Parkash O (2019) End of study results from LIMT HDV study: 36% durable virologic response at 24 weeks post-treatment with pegylated interferon lambda monotherapy in patients with chronic hepatitis delta virus infection. *J. Hepatol.* 70(1):e32.
- European Association for the Study of the Liver (2017) EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 67(2):370-398.
- Fahmy AM, Khabir M, Blanchet M & Labonte P (2018) LC3B is not recruited along with the autophagy elongation complex (ATG5-12/16L1) at HCV replication site and is dispensable for viral replication. *PLoS One* 13(10):e0205189.

- Fahmy AM & Labonte P (2017) The autophagy elongation complex (ATG5-12/16L1) positively regulates HCV replication and is required for wild-type membranous web formation. *Sci. Rep.* 7:40351.
- Fallows DA & Goff SP (1995) Mutations in the epsilon sequences of human hepatitis B virus affect both RNA encapsidation and reverse transcription. *J. Virol.* 69(5):3067-3073.
- Fang T, Lv H, Lv G, Li T, Wang C, Han Q, Yu L, Su B, Guo L, Huang S, Cao D, Tang L, Tang S, Wu M, Yang W & Wang H (2018) Tumor-derived exosomal miR-1247-3p induces cancerassociated fibroblast activation to foster lung metastasis of liver cancer. *Nat Commun* 9(1):191.
- Fanning GC, Zoulim F, Hou J & Bertoletti A (2019) Therapeutic strategies for hepatitis B virus infection: towards a cure. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10.1038/s41573-019-0037-0.
- Fattovich G, Bortolotti F & Donato F (2008) Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J. Hepatol.* 48(2):335-352.
- Feng W, Dean DC, Hornicek FJ, Shi H & Duan Z (2019) Exosomes promote pre-metastatic niche formation in ovarian cancer. *Mol. Cancer* 18(1):124.
- Feng Y, He D, Yao Z & Klionsky DJ (2014) The machinery of macroautophagy. *Cell Res.* 24(1):24-41.
- Feng Z, Hensley L, McKnight KL, Hu F, Madden V, Ping L, Jeong SH, Walker C, Lanford RE & Lemon SM (2013) A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. *Nature* 496(7445):367-371.
- Fernholz D, Galle PR, Stemler M, Brunetto M, Bonino F & Will H (1993) Infectious hepatitis B virus variant defective in pre-S2 protein expression in a chronic carrier. *Virology* 194(1):137-148.
- Fernholz D, Stemler M, Brunetto M, Bonino F & Will H (1991) Replicating and virion secreting hepatitis B mutant virus unable to produce preS2 protein. *J. Hepatol.* 13 Suppl 4:S102-104.
- Ferraris P, Blanchard E & Roingeard P (2010) Ultrastructural and biochemical analyses of hepatitis C virus-associated host cell membranes. *J. Gen. Virol.* 91(Pt 9):2230-2237.
- Flores R, Owens RA & Taylor J (2016) Pathogenesis by subviral agents: viroids and hepatitis delta virus. *Curr. Opin. Virol.* 17:87-94.
- Freitas N, Cunha C, Menne S & Gudima SO (2014) Envelope proteins derived from naturally integrated hepatitis B virus DNA support assembly and release of infectious hepatitis delta virus particles. *J. Virol.* 88(10):5742-5754.
- Freitas N, Salisse J, Cunha C, Toshkov I, Menne S & Gudima SO (2012) Hepatitis delta virus infects the cells of hepadnavirus-induced hepatocellular carcinoma in woodchucks. *Hepatology* 56(1):76-85.
- FU-LIN CHANG, PEI-JER CHEN & SU-JEN Tu C-JW, AND DING-SHINN CHEN (1991) The large form of hepatitis 6 antigen is crucial for assembly of
- hepatitis 6 virus. Microbiology 88:8490-8494.
- Fu TB & Taylor J (1993) The RNAs of hepatitis delta virus are copied by RNA polymerase II in nuclear homogenates. *J. Virol.* 67(12):6965-6972.

- Fujita N, Hayashi-Nishino M, Fukumoto H, Omori H, Yamamoto A, Noda T & Yoshimori T (2008) An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and causes defects in autophagosome closure. *Mol. Biol. Cell* 19(11):4651-4659.
- Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P & Charnay P (1979) Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in E. coli. *Nature* 281(5733):646-650.
- Galle PR, Hagelstein J, Kommerell B, Volkmann M, Schranz P & Zentgraf H (1994) In vitro experimental infection of primary human hepatocytes with hepatitis B virus. *Gastroenterology* 106(3):664-673.
- Gallucci L & Kann M (2017) Nuclear Import of Hepatitis B Virus Capsids and Genome. *Viruses* 9(1).
- Ganem D, Pollack JR & Tavis J (1994) Hepatitis B virus reverse transcriptase and its many roles in hepadnaviral genomic replication. *Infect. Agents Dis.* 3(2-3):85-93.
- Ganley IG, Lam du H, Wang J, Ding X, Chen S & Jiang X (2009) ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J. Biol. Chem.* 284(18):12297-12305.
- Gao Q, Hou B, Yang H & Jiang X (2019) Distinct role of 4E-BP1 and S6K1 in regulating autophagy and hepatitis B virus (HBV) replication. *Life Sci.* 220:1-7.
- Garcia T, Li J, Sureau C, Ito K, Qin Y, Wands J & Tong S (2009) Drastic reduction in the production of subviral particles does not impair hepatitis B virus virion secretion. *J. Virol.* 83(21):11152-11165.
- Gerlich WH (2013) Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now. *Virol J.* 10:239.
- Gerlich WH & Robinson WS (1980) Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* 21(3):801-809.
- Germain K & Kim PK (2020) Pexophagy: A Model for Selective Autophagy. Int. J. Mol. Sci. 21(2).
- Giersch K, Allweiss L, Volz T, Helbig M, Bierwolf J, Lohse AW, Pollok JM, Petersen J, Dandri M & Lutgehetmann M (2015) Hepatitis Delta co-infection in humanized mice leads to pronounced induction of innate immune responses in comparison to HBV mono-infection. *J. Hepatol.* 63(2):346-353.
- Giersch K, Bhadra OD, Volz T, Allweiss L, Riecken K, Fehse B, Lohse AW, Petersen J, Sureau C, Urban S, Dandri M & Lütgehetmann M (2019) Hepatitis delta virus persists during liver regeneration and is amplified through cell division both in vitro and in vivo. *Gut* 68(1):150-157.
- Giersch K, Homs M, Volz T, Helbig M, Allweiss L, Lohse AW, Petersen J, Buti M, Pollicino T, Sureau C, Dandri M & Lütgehetmann M (2017) Both interferon alpha and lambda can reduce all intrahepatic HDV infection markers in HBV/HDV infected humanized mice. *Sci. Rep.* 7(1):3757.
- Gilman C, Heller T & Koh C (2019) Chronic hepatitis delta: A state-of-the-art review and new therapies. *World Journal of*
- Gastroenterology 25(32): 4580-4597.
- Gkouvatsos K, Goossens N, Spahr L & Negro F (2017) [Hepatitis B: new guidelines of disease management]. *Rev. Med. Suisse* 13(572):1458-1463.

- Glenn JS, Taylor JM & White JM (1990) In vitro-synthesized hepatitis delta virus RNA initiates genome replication in cultured cells. *J. Virol.* 64(6):3104-3107.
- Glenn JS, Watson JA, Havel CM & White JM (1992a) Identification of a prenylation site in delta virus large antigen. *Science* 256(5061):1331-1333.
- Glenn JS, Watson JA, Havel CM & White JM (1992b) Identification of a prenylation site in delta virus large antigen. *Science* 256(5061):1331-1333.
- Glenn JS & White JM (1991) trans-dominant inhibition of human hepatitis delta virus genome replication. *J. Virol.* 65(5):2357-2361.
- Glick D, Barth S & Macleod KF (2010) Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.* 221(1):3-12.
- Godbole NM, Sinha RA, Tiwari S, Pawar SD & Dhole TN (2020) Analysis of influenza virusinduced perturbation in autophagic flux and its modulation during Vitamin D3 mediated anti-apoptotic signaling. *Virus Res.* 282:197936.
- Gordien E, Rosmorduc O, Peltekian C, Garreau F, Brechot C & Kremsdorf D (2001) Inhibition of hepatitis B virus replication by the interferon-inducible MxA protein. *J. Virol.* 75(6):2684-2691.
- Gottlieb RA, Andres AM, Sin J & Taylor DP (2015) Untangling autophagy measurements: all fluxed up. *Circ. Res.* 116(3):504-514.
- Gould SJ, Booth AM & Hildreth JE (2003) The Trojan exosome hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* U. S. A. 100(19):10592-10597.
- Gouvernement de canada (2017) Report on hepatitis B and C in Canada: 2017.
- Gouvernement du Canada (2020) *Hepatitis B Vaccine: Canadian Immunization Guide* Gouvernement du Canada, Ottawa,
- Gouvernement du Canada (2017) Report on hepatitis B and C in Canada: 2017.
- Greco-Stewart VS, Miron P, Abrahem A & Pelchat M (2007) The human RNA polymerase II interacts with the terminal stem-loop regions of the hepatitis delta virus RNA genome. *Virology* 357(1):68-78.
- Greco-Stewart VS, Schissel E & Pelchat M (2009) The hepatitis delta virus RNA genome interacts with the human RNA polymerases I and III. *Virology* 386(1):12-15.
- Greenberg HB, Pollard RB, Lutwick LI, Gregory PB, Robinson WS & Merigan TC (1976) Effect of human leukocyte interferon on hepatitis B virus infection in patients with chronic active hepatitis. *N. Engl. J. Med.* 295(10):517-522.
- Gripon P, Cannie I & Urban S (2005) Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein. *J. Virol.* 79(3):1613-1622.
- Gripon P, Diot C & Guguen-Guillouzo C (1993) Reproducible high level infection of cultured adult human hepatocytes by hepatitis B virus: effect of polyethylene glycol on adsorption and penetration. *Virology* 192(2):534-540.
- Gripon P, Diot C, Thézé N, Fourel I, Loreal O, Brechot C & Guguen-Guillouzo C (1988) Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide. *J. Virol.* 62(11):4136-4143.
- Gripon P, Le Seyec J, Rumin S & Guguen-Guillouzo C (1995) Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity. *Virology* 213(2):292-299.

- Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C & Guguen-Guillouzo C (2002) Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99(24):15655-15660.
- Gudima S, Chang J, Moraleda G, Azvolinsky A & Taylor J (2002) Parameters of Human Hepatitis Delta Virus Genome Replication: the Quantity, Quality, and Intracellular Distribution of Viral Proteins and RNA. *J. Virol.* 76(8):3709-3719.
- Guevin C, Manna D, Belanger C, Konan KV, Mak P & Labonte P (2010) Autophagy protein ATG5 interacts transiently with the hepatitis C virus RNA polymerase (NS5B) early during infection. *Virology* 405(1):1-7.
- Guévin C, Manna D, Bélanger C, Konan KV, Mak P & Labonté P (2010) Autophagy protein ATG5 interacts transiently with the hepatitis C virus RNA polymerase (NS5B) early during infection. *Virology* 405(1):1-7.
- Gunn PJ, Green CJ, Pramfalk C & Hodson L (2017) In vitro cellular models of human hepatic fatty acid metabolism: differences between Huh7 and HepG2 cell lines in human and fetal bovine culturing serum. *Physiol Rep* 5(24).
- Guo JT & Pugh JC (1997) Topology of the large envelope protein of duck hepatitis B virus suggests a mechanism for membrane translocation during particle morphogenesis. *J. Virol.* 71(2):1107-1114.
- Guo L, Wang D, Ouyang X, Tang N, Chen X, Zhang Y, Zhu H & Li X (2018) Recent Advances in HBV Reactivation Research. *Biomed Res Int* 2018:2931402.
- Guo WT, Wang J, Tam G, Yen TS & Ou JS (1991) Leaky transcription termination produces larger and smaller than genome size hepatitis B virus X gene transcripts. *Virology* 181(2):630-636.
- Gurunathan S, Kang MH, Jeyaraj M, Qasim M & Kim JH (2019) Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells* 8(4).
- Gutzeit C, Nagy N, Gentile M, Lyberg K, Gumz J, Vallhov H, Puga I, Klein E, Gabrielsson S, Cerutti A & Scheynius A (2014) Exosomes derived from Burkitt's lymphoma cell lines induce proliferation, differentiation, and class-switch recombination in B cells. *J. Immunol.* 192(12):5852-5862.
- Gyorgy B, Szabo TG, Pasztoi M, Pal Z, Misjak P, Aradi B, Laszlo V, Pallinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A & Buzas El (2011) Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci.* 68(16):2667-2688.
- Haines KM & Loeb DD (2007) The sequence of the RNA primer and the DNA template influence the initiation of plus-strand DNA synthesis in hepatitis B virus. *J. Mol. Biol.* 370(3):471-480.
- Han Z, Alves C, Gudima S & Taylor J (2009) Intracellular localization of hepatitis delta virus proteins in the presence and absence of viral RNA accumulation. *J. Virol.* 83(13):6457-6463.
- Hanada T, Noda NN, Satomi Y, Ichimura Y, Fujioka Y, Takao T, Inagaki F & Ohsumi Y (2007) The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J. Biol. Chem.* 282(52):37298-37302.
- Harding C, Heuser J & Stahl P (1983) Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol.* 97(2):329-339.

- Harding CV, Heuser JE & Stahl PD (2013) Exosomes: looking back three decades and into the future. J. Cell Biol. 200(4):367-371.
- Harichandran K, Shen Y, Stephenson Tsoris S, Lee SC & Casey JL (2019) Hepatitis Delta Antigen Regulates mRNA and Antigenome RNA Levels during Hepatitis Delta Virus Replication. *J. Virol.* 93(8).
- Hartmann-Stuhler C & Prange R (2001) Hepatitis B virus large envelope protein interacts with gamma2-adaptin, a clathrin adaptor-related protein. *J. Virol.* 75(11):5343-5351.
- Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, Seyffarth T, Baumgarten H & Gerlich WH (1984) Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J. Virol.* 52(2):396-402.
- Henne WM, Buchkovich NJ & Emr SD (2011) The ESCRT pathway. Dev. Cell 21(1):77-91.
- Henne WM, Stenmark H & Emr SD (2013) Molecular mechanisms of the membrane sculpting ESCRT pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5(9).
- Herrscher C, Pastor F, Burlaud-Gaillard J, Dumans A, Seigneuret F, Moreau A, Patient R, Eymieux S, de Rocquigny H, Hourioux C, Roingeard P & Blanchard E (2020) Hepatitis B virus entry into HepG2-NTCP cells requires clathrin-mediated endocytosis. *Cell. Microbiol.* 22(8):e13205.
- Hessvik NP & Llorente A (2018) Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell. Mol. Life Sci.* 75(2):193-208.
- Heung Kyu Lee, Jennifer M. Lund, Balaji Ramanathan, Noboru Mizushima & Iwasaki1 A (2007) Autophagy-Dependent Viral Recognition by Plasmacytoid Dendritic Cells. *Science* 315:1398-1401.
- Hong SY & Chen PJ (2010) Phosphorylation of serine 177 of the small hepatitis delta antigen regulates viral antigenomic RNA replication by interacting with the processive RNA polymerase II. *J. Virol.* 84(3):1430-1438.
- Hoofnagle JH (1981) Serologic markers of hepatitis B virus infection. Annu. Rev. Med. 32:1-11.
- Hoofnagle JH (2009) Reactivation of hepatitis B. Hepatology 49(5 Suppl):S156-165.
- Horibe S, Tanahashi T, Kawauchi S, Murakami Y & Rikitake Y (2018) Mechanism of recipient cell-dependent differences in exosome uptake. *BMC Cancer* 18(1):47.
- Hosokawa N, Sasaki T, Iemura S, Natsume T, Hara T & Mizushima N (2009) Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy* 5(7):973-979.
- Hsieh SY, Chao M, Coates L & Taylor J (1990) Hepatitis delta virus genome replication: a polyadenylated mRNA for delta antigen. *J. Virol.* 64(7):3192-3198.
- Huan Yan GZ, Guangwei Xu2, Wenhui He2,3, Zhiyi Jing2,, Zhenchao Gao1, Yi Huang2,3, Yonghe Qi2, Bo Peng2, Haimin Wang2, Liran Fu2,3,, Mei Song2, Pan Chen2,3, Wenqing Gao2, Bijie Ren2, Yinyan Sun2, Tao Cai2, & Xiaofeng Feng2 JS, Wenhui Li2* (2012) Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLIFE* 1:1-28.
- Huang C, Chang SC, Yang HC, Chien CL & Chang MF (2009) Clathrin-mediated post-Golgi membrane trafficking in the morphogenesis of hepatitis delta virus. *J. Virol.* 83(23):12314-12324.
- Huang C, Chang SC, Yu IC, Tsay YG & Chang MF (2007) Large hepatitis delta antigen is a novel clathrin adaptor-like protein. *J. Virol.* 81(11):5985-5994.

- Huang CR & Lo SJ (2014) Hepatitis D virus infection, replication and cross-talk with the hepatitis B virus. *World J. Gastroenterol.* 20(40):14589-14597.
- Huang HC, Chen CC, Chang WC, Tao MH & Huang C (2012) Entry of hepatitis B virus into immortalized human primary hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. *J. Virol.* 86(17):9443-9453.
- Huang HC, Lee CP, Liu HK, Chang MF, Lai YH, Lee YC & Huang C (2016) Cellular Nuclear Export Factors TAP and Aly Are Required for HDAg-L-mediated Assembly of Hepatitis Delta Virus. *J. Biol. Chem.* 291(50):26226-26238.
- Huang TJ, Lu CC, Tsai JC, Yao WJ, Lu X, Lai MD, Liu HS & Shiau AL (2005) Novel autoregulatory function of hepatitis B virus M protein on surface gene expression. *J. Biol. Chem.* 280(30):27742-27754.
- Huang WH, Mai RT & Lee YH (2008) Transcription factor YY1 and its associated acetyltransferases CBP and p300 interact with hepatitis delta antigens and modulate hepatitis delta virus RNA replication. *J. Virol.* 82(15):7313-7324.
- Huang ZS & Wu HN (1998) Identification and characterization of the RNA chaperone activity of hepatitis delta antigen peptides. *J. Biol. Chem.* 273(41):26455-26461.
- Huovila AP, Eder AM & Fuller SD (1992) Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment. *J. Cell Biol.* 118(6):1305-1320.
- Hwang SB & Lai MM (1993) Isoprenylation mediates direct protein-protein interactions between hepatitis large delta antigen and hepatitis B virus surface antigen. *J. Virol.* 67(12):7659-7662.
- Imazeki F, Yaginuma K, Omata M, Okuda K, Kobayashi M & Koike K (1987) RNA transcripts of hepatitis B virus in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 7(4):753-757.
- Inoue J, Krueger EW, Chen J, Cao H, Ninomiya M & McNiven MA (2015) HBV secretion is regulated through the activation of endocytic and autophagic compartments mediated by Rab7 stimulation. *J. Cell Sci.* 128(9):1696-1706.
- Inoue J, Ninomiya M, Shimosegawa T & McNiven MA (2018) Cellular membrane trafficking machineries utilized by the hepatitis viruses. *Hepatology* 10.1002/hep.29785.
- Itakura E, Kishi-Itakura C & Mizushima N (2012) The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell* 151(6):1256-1269.
- Jackson WT (2015) Viruses and the autophagy pathway. Virology 479-480:450-456.
- Jardi R, Rodriguez F, Buti M, Costa X, Cotrina M, Galimany R, Esteban R & Guardia J (2001) Role of hepatitis B, C, and D viruses in dual and triple infection: influence of viral genotypes and hepatitis B precore and basal core promoter mutations on viral replicative interference. *Hepatology* 34(2):404-410.
- Jaworski E, Narayanan A, Van Duyne R, Shabbeer-Meyering S, Iordanskiy S, Saifuddin M, Das R, Afonso PV, Sampey GC, Chung M, Popratiloff A, Shrestha B, Sehgal M, Jain P, Vertes A, Mahieux R & Kashanchi F (2014) Human T-lymphotropic virus type 1-infected cells secrete exosomes that contain Tax protein. *J. Biol. Chem.* 289(32):22284-22305.
- Ji E, Kim C, Kang H, Ahn S, Jung M, Hong Y, Tak H, Lee S, Kim W & Lee EK (2019) RNA Binding Protein HuR Promotes Autophagosome Formation by Regulating Expression of Autophagy-Related Proteins 5, 12, and 16 in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Mol. Cell. Biol.* 39(6).

- Jia X, Chen J, Megger DA, Zhang X, Kozlowski M, Zhang L, Fang Z, Li J, Chu Q, Wu M, Li Y, Sitek B & Yuan Z (2017) Label-free Proteomic Analysis of Exosomes Derived from Inducible Hepatitis B Virus-Replicating HepAD38 Cell Line. *Mol. Cell. Proteomics* 16(4 suppl 1):S144-S160.
- Jiang B, Himmelsbach K, Ren H, Boller K & Hildt E (2015) Subviral Hepatitis B Virus Filaments, like Infectious Viral Particles, Are Released via Multivesicular Bodies. *J. Virol.* 90(7):3330-3341.
- Jiang P, Nishimura T, Sakamaki Y, Itakura E, Hatta T, Natsume T & Mizushima N (2014) The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Mol. Biol. Cell* 25(8):1327-1337.
- Johansen T & Lamark T (2020) Selective Autophagy: ATG8 Family Proteins, LIR Motifs and Cargo Receptors. J. Mol. Biol. 432(1):80-103.
- Johnstone RM (2005) Revisiting the road to the discovery of exosomes. *Blood Cells Mol. Dis.* 34(3):214-219.
- Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L & Turbide C (1987) Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). J. Biol. Chem. 262(19):9412-9420.
- Jounai N, Takeshita F, Kobiyama K, Sawano A, Miyawaki A, Xin KQ, Ishii KJ, Kawai T, Akira S, Suzuki K & Okuda K (2007) The Atg5 Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104(35):14050-14055.
- Juliano RL (2018) Intracellular Trafficking and Endosomal Release of Oligonucleotides: What We Know and What We Don't. *Nucleic Acid Ther.* 28(3):166-177.
- Julithe R, Abou-Jaoude G & Sureau C (2014) Modification of the hepatitis B virus envelope protein glycosylation pattern interferes with secretion of viral particles, infectivity, and susceptibility to neutralizing antibodies. *J. Virol.* 88(16):9049-9059.
- Jung S, Altstetter SM, Wilsch F, Shein M, Schütz AK & Protzer U (2020) Extracellular vesicles derived from Hepatitis-D Virus infected cells induce a proinflammatory cytokine response in human peripheral blood mononuclear cells and macrophages. *sciencematters*.
- Junker-Niepmann M, Bartenschlager R & Schaller H (1990) A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *EMBO J.* 9(10):3389-3396.
- Kanemoto S, Nitani R, Murakami T, Kaneko M, Asada R, Matsuhisa K, Saito A & Imaizumi K (2016) Multivesicular body formation enhancement and exosome release during endoplasmic reticulum stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 480(2):166-172.
- Kann M, Bischof A & Gerlich WH (1997) In vitro model for the nuclear transport of the hepadnavirus genome. *J. Virol.* 71(2):1310-1316.
- Kaplan PM, Ford EC, Purcell RH & Gerin JL (1976) Demonstration of subpopulations of Dane particles. *J. Virol.* 17(3):885-893.
- Kapoor NR, Chadha R, Kumar S, Choedon T, Reddy VS & Kumar V (2017) The HBx gene of hepatitis B virus can influence hepatic microenvironment via exosomes by transferring its mRNA and protein. *Virus Res.* 240:166-174.
- Karayiannis P (2017) Hepatitis B virus: virology, molecular biology, life cycle and intrahepatic spread. *Hepatol. Int.* 11(6):500-508.
Kassab S (2014) Variabilité du virus de l'Hépatite B. (UNIVERSITÉ DE BORDEAUX).

- Ke PY & Chen SS (2011) Autophagy: a novel guardian of HCV against innate immune response. *Autophagy* 7(5):533-535.
- Khabir M, Aliche AZ, Sureau C, Blanchet M & Labonté P (2020) Hepatitis Delta Virus Alters the Autophagy Process To Promote Its Genome Replication. *J. Virol.* 94(4).
- Khan G, Ahmed W & Philip PS (2017) Exosomes and Their Role in Viral Infections. *Novel Implications of Exosomes in Diagnosis and Treatment of Cancer and Infectious Diseases*, 10.5772/intechopen.69397.
- Khatua AK, Taylor HE, Hildreth JE & Popik W (2009) Exosomes packaging APOBEC3G confer human immunodeficiency virus resistance to recipient cells. *J. Virol.* 83(2):512-521.
- Kian Chua P, Lin MH & Shih C (2006) Potent inhibition of human Hepatitis B virus replication by a host factor Vps4. *Virology* 354(1):1-6.
- Kim N, Kim MJ, Sung PS, Bae YC, Shin EC & Yoo JY (2016) Interferon-inducible protein SCOTIN interferes with HCV replication through the autolysosomal degradation of NS5A. *Nat Commun* 7:10631.
- Klionsky DJ (2007) Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8(11):931-937.
- Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, Adachi H, Adams CM, Adams PD, Adeli K, Adhihetty PJ, Adler SG, Agam G, Agarwal R, Aghi MK, Agnello M, Agostinis P, Aguilar PV, Aguirre-Ghiso J, Airoldi EM, Ait-Si-Ali S, Akematsu T, Akporiaye ET, Al-Rubeai M, Albaiceta GM, Albanese C, Albani D, Albert ML, Aldudo J, Algul H, Alirezaei M, Alloza I, Almasan A, Almonte-Beceril M, Alnemri ES, Alonso C, Altan-Bonnet N, Altieri DC, Alvarez S, Alvarez-Erviti L, Alves S, Amadoro G, Amano A, Amantini C, Ambrosio S, Amelio I, Amer AO, Amessou M, Amon A, An Z, Anania FA, Andersen SU, Andley UP, Andreadi CK, Andrieu-Abadie N, Anel A, Ann DK, Anoopkumar-Dukie S, Antonioli M, Aoki H, Apostolova N, Aquila S, Aquilano K, Araki K, Arama E, Aranda A, Araya J, Arcaro A, Arias E, Arimoto H, Ariosa AR, Armstrong JL, Arnould T, Arsov I, Asanuma K, Askanas V, Asselin E, Atarashi R, Atherton SS, Atkin JD, Attardi LD, Auberger P, Auburger G, Aurelian L, Autelli R, Avagliano L, Avantaggiati ML, Avrahami L, Awale S, Azad N, Bachetti T, Backer JM, Bae DH, Bae JS, Bae ON, Bae SH, Baehrecke EH, Baek SH, Baghdiguian S, Bagniewska-Zadworna A, Bai H, Bai J, Bai XY, Bailly Y, Balaji KN, Balduini W, Ballabio A, Balzan R, Banerjee R, Banhegyi G, Bao H, Barbeau B, Barrachina MD, Barreiro E, Bartel B, Bartolome A, Bassham DC, Bassi MT, Bast RC, Jr., Basu A, Batista MT, Batoko H, Battino M, Bauckman K, Baumgarner BL, Bayer KU, Beale R, Beaulieu JF, Beck GR, Jr., Becker C, Beckham JD, Bedard PA, Bednarski PJ, Beglev TJ, Behl C, Behrends C, Behrens GM, Behrns KE, Bejarano E, Belaid A, Belleudi F, Benard G, Berchem G, Bergamaschi D, Bergami M, Berkhout B, Berliocchi L, Bernard A, Bernard M, Bernassola F, Bertolotti A, Bess AS, Besteiro S, Bettuzzi S, Bhalla S, Bhattacharyya S, Bhutia SK, Biagosch C, Bianchi MW, Biard-Piechaczyk M, Billes V, Bincoletto C, Bingol B, Bird SW, Bitoun M, Bjedov I, Blackstone C, Blanc L, Blanco GA, Blomhoff HK, Boada-Romero E, Bockler S, Boes M, Boesze-Battaglia K, Boise LH, Bolino A, Boman A, Bonaldo P, Bordi M, Bosch J, Botana LM, Botti J, Bou G, Bouche M, Bouchecareilh M, Boucher MJ, Boulton ME, Bouret SG, Boya P, Boyer-Guittaut M, Bozhkov PV, Brady N, Braga VM, Brancolini C, Braus GH, Bravo-San Pedro JM, Brennan LA. Bresnick EH. Brest P. Bridges D. Bringer MA. Brini M. Brito GC. Brodin B. Brookes PS, Brown EJ, Brown K, Broxmeyer HE, Bruhat A, Brum PC, Brumell JH, Brunetti-Pierri N, Bryson-Richardson RJ, Buch S, Buchan AM, Budak H, Bulavin DV, Bultman SJ,

Bultvnck G. Bumbasirevic V. Burelle Y. Burke RE. Burmeister M. Butikofer P. Caberlotto L, Cadwell K, Cahova M, Cai D, Cai J, Cai Q, Calatayud S, Camougrand N, Campanella M, Campbell GR, Campbell M, Campello S, Candau R, Caniggia I, Cantoni L, Cao L, Caplan AB, Caraglia M, Cardinali C, Cardoso SM, Carew JS, Carleton LA, Carlin CR, Carloni S, Carlsson SR, Carmona-Gutierrez D, Carneiro LA, Carnevali O, Carra S, Carrier A, Carroll B, Casas C, Casas J, Cassinelli G, Castets P, Castro-Obregon S, Cavallini G, Ceccherini I, Cecconi F, Cederbaum AI, Cena V, Cenci S, Cerella C, Cervia D, Cetrullo S, Chaachouay H, Chae HJ, Chagin AS, Chai CY, Chakrabarti G, Chamilos G, Chan EY, Chan MT, Chandra D, Chandra P, Chang CP, Chang RC, Chang TY, Chatham JC, Chatterjee S, Chauhan S, Che Y, Cheetham ME, Cheluvappa R, Chen CJ, Chen G, Chen GC, Chen G, Chen H, Chen JW, Chen JK, Chen M, Chen M, Chen P, Chen Q, Chen Q, Chen SD, Chen S, Chen SS, Chen W, Chen WJ, Chen WQ, Chen W, Chen X, Chen YH, Chen YG, Chen Y, Chen Y, Chen YJ, Chen YJ, Chen YQ, Chen Y, Chen Z, Chen Z, Cheng A, Cheng CH, Cheng H, Cheong H, Cherry S, Chesney J, Cheung CH, Chevet E, Chi HC, Chi SG, Chiacchiera F, Chiang HL, Chiarelli R, Chiariello M, Chieppa M, Chin LS, Chiong M, Chiu GN, Cho DH, Cho SG, Cho WC, Cho YY, Cho YS, Choi AM, Choi EJ, Choi EK, Choi J, Choi ME, Choi SI, Chou TF, Chouaib S, Choubey D, Choubey V, Chow KC, Chowdhury K, Chu CT, Chuang TH, Chun T, Chung H, Chung T, Chung YL, Chwae YJ, Cianfanelli V, Ciarcia R, Ciechomska IA, Ciriolo MR, Cirone M, Claerhout S, Clague MJ, Claria J, Clarke PG, Clarke R, Clementi E, Cleyrat C, Cnop M, Coccia EM, Cocco T, Codogno P, Coers J, Cohen EE, Colecchia D, Coletto L, Coll NS, Colucci-Guyon E, Comincini S, Condello M, Cook KL, Coombs GH, Cooper CD, Cooper JM, Coppens I, Corasaniti MT, Corazzari M, Corbalan R, Corcelle-Termeau E, Cordero MD, Corral-Ramos C, Corti O, Cossarizza A, Costelli P, Costes S, Cotman SL, Coto-Montes A, Cottet S, Couve E, Covey LR, Cowart LA, Cox JS, Coxon FP, Covne CB, Cragg MS, Craven RJ, Crepaldi T, Crespo JL, Criollo A, Crippa V, Cruz MT, Cuervo AM, Cuezva JM, Cui T, Cutillas PR, Czaja MJ, Czyzyk-Krzeska MF, Dagda RK, Dahmen U, Dai C, Dai W, Dai Y, Dalby KN, Dalla Valle L, Dalmasso G, D'Amelio M, Damme M, Darfeuille-Michaud A, Dargemont C, Darley-Usmar VM, Dasarathy S, Dasgupta B, Dash S, Dass CR, Davey HM, Davids LM, Davila D, Davis RJ, Dawson TM, Dawson VL, Daza P, de Belleroche J, de Figueiredo P. de Figueiredo RC, de la Fuente J. De Martino L. De Matteis A. De Mever GR, De Milito A, De Santi M, de Souza W, De Tata V, De Zio D, Debnath J, Dechant R, Decuypere JP, Deegan S, Dehay B, Del Bello B, Del Re DP, Delage-Mourroux R, Delbridge LM, Deldicque L, Delorme-Axford E, Deng Y, Dengjel J, Denizot M, Dent P, Der CJ, Deretic V, Derrien B, Deutsch E, Devarenne TP, Devenish RJ, Di Bartolomeo S, Di Daniele N, Di Domenico F, Di Nardo A, Di Paola S, Di Pietro A, Di Renzo L, DiAntonio A, Diaz-Araya G, Diaz-Laviada I, Diaz-Meco MT, Diaz-Nido J, Dickey CA, Dickson RC, Diederich M, Digard P, Dikic I, Dinesh-Kumar SP, Ding C, Ding WX, Ding Z, Dini L, Distler JH, Diwan A, Djavaheri-Mergny M, Dmytruk K, Dobson RC, Doetsch V, Dokladny K, Dokudovskaya S, Donadelli M, Dong XC, Dong X, Dong Z, Donohue TM, Jr., Doran KS, D'Orazi G, Dorn GW, 2nd, Dosenko V, Dridi S, Drucker L, Du J, Du LL, Du L, du Toit A, Dua P, Duan L, Duann P, Dubey VK, Duchen MR, Duchosal MA, Duez H, Dugail I, Dumit VI, Duncan MC, Dunlop EA, Dunn WA, Jr., Dupont N, Dupuis L, Duran RV, Durcan TM, Duvezin-Caubet S, Duvvuri U, Eapen V, Ebrahimi-Fakhari D, Echard A, Eckhart L, Edelstein CL, Edinger AL, Eichinger L, Eisenberg T, Eisenberg-Lerner A, Eissa NT, El-Deiry WS, El-Khoury V, Elazar Z, Eldar-Finkelman H, Elliott CJ, Emanuele E, Emmenegger U, Engedal N, Engelbrecht AM, Engelender S, Enserink JM, Erdmann R, Erenpreisa J, Eri R, Eriksen JL, Erman A, Escalante R, Eskelinen EL, Espert L, Esteban-Martinez L, Evans TJ, Fabri M, Fabrias G, Fabrizi C, Facchiano A, Faergeman NJ, Faggioni A, Fairlie WD, Fan C, Fan D, Fan J, Fang S, Fanto M, Fanzani A, Farkas T, Faure M, Favier FB, Fearnhead H, Federici M, Fei E, Felizardo TC, Feng H, Feng Y, Feng

Y. Ferguson TA. Fernandez AF. Fernandez-Barrena MG. Fernandez-Checa JC. Fernandez-Lopez A, Fernandez-Zapico ME, Feron O, Ferraro E, Ferreira-Halder CV, Fesus L, Feuer R, Fiesel FC, Filippi-Chiela EC, Filomeni G, Fimia GM, Fingert JH, Finkbeiner S, Finkel T, Fiorito F, Fisher PB, Flajolet M, Flamigni F, Florey O, Florio S, Floto RA, Folini M, Follo C, Fon EA, Fornai F, Fortunato F, Fraldi A, Franco R, Francois A, Francois A, Frankel LB, Fraser ID, Frey N, Freyssenet DG, Frezza C, Friedman SL, Frigo DE, Fu D, Fuentes JM, Fueyo J, Fujitani Y, Fujiwara Y, Fujiya M, Fukuda M, Fulda S, Fusco C, Gabryel B, Gaestel M, Gailly P, Gajewska M, Galadari S, Galili G, Galindo I, Galindo MF, Galliciotti G, Galluzzi L, Galluzzi L, Galy V, Gammoh N, Gandy S, Ganesan AK, Ganesan S, Ganley IG, Gannage M, Gao FB, Gao F, Gao JX, Garcia Nannig L, Garcia Vescovi E, Garcia-Macia M, Garcia-Ruiz C, Garg AD, Garg PK, Gargini R, Gassen NC, Gatica D, Gatti E, Gavard J, Gavathiotis E, Ge L, Ge P, Ge S, Gean PW, Gelmetti V, Genazzani AA, Geng J, Genschik P, Gerner L, Gestwicki JE, Gewirtz DA, Ghavami S, Ghigo E, Ghosh D, Giammarioli AM, Giampieri F, Giampietri C, Giatromanolaki A, Gibbings DJ. Gibellini L. Gibson SB. Ginet V. Giordano A. Giorgini F. Giovannetti E. Girardin SE, Gispert S, Giuliano S, Gladson CL, Glavic A, Gleave M, Godefroy N, Gogal RM, Jr., Gokulan K, Goldman GH, Goletti D, Goligorsky MS, Gomes AV, Gomes LC, Gomez H, Gomez-Manzano C, Gomez-Sanchez R, Goncalves DA, Goncu E, Gong Q, Gongora C, Gonzalez CB, Gonzalez-Alegre P, Gonzalez-Cabo P, Gonzalez-Polo RA, Goping IS, Gorbea C, Gorbunov NV, Goring DR, Gorman AM, Gorski SM, Goruppi S, Goto-Yamada S, Gotor C, Gottlieb RA, Gozes I, Gozuacik D, Graba Y, Graef M, Granato GE, Grant GD, Grant S, Gravina GL, Green DR, Greenhough A, Greenwood MT, Grimaldi B, Gros F, Grose C, Groulx JF, Gruber F, Grumati P, Grune T, Guan JL, Guan KL, Guerra B, Guillen C, Gulshan K, Gunst J, Guo C, Guo L, Guo M, Guo W, Guo XG, Gust AA. Gustafsson AB, Gutierrez E, Gutierrez MG, Gwak HS, Haas A, Haber JE, Hadano S, Hagedorn M, Hahn DR, Halayko AJ, Hamacher-Brady A, Hamada K, Hamai A, Hamann A, Hamasaki M, Hamer I, Hamid Q, Hammond EM, Han F, Han W, Handa JT, Hanover JA, Hansen M, Harada M, Harhaii-Traikovic L, Harper JW, Harrath AH, Harris AL, Harris J, Hasler U, Hasselblatt P, Hasui K, Hawley RG, Hawley TS, He C, He CY, He F, He G, He RR, He XH, He YW, He YY, Heath JK, Hebert MJ, Heinzen RA, Helgason GV, Hensel M, Henske EP, Her C, Herman PK, Hernandez A, Hernandez C, Hernandez-Tiedra S, Hetz C, Hiesinger PR, Higaki K, Hilfiker S, Hill BG, Hill JA, Hill WD, Hino K, Hofius D, Hofman P, Hoglinger GU, Hohfeld J, Holz MK, Hong Y, Hood DA, Hoozemans JJ, Hoppe T, Hsu C, Hsu CY, Hsu LC, Hu D, Hu G, Hu HM, Hu H, Hu MC, Hu YC, Hu ZW, Hua F, Hua Y, Huang C, Huang HL, Huang KH, Huang KY, Huang S, Huang S, Huang WP, Huang YR, Huang Y, Huang Y, Huber TB, Huebbe P, Huh WK, Hulmi JJ, Hur GM, Hurley JH, Husak Z, Hussain SN, Hussain S, Hwang JJ, Hwang S, Hwang TI, Ichihara A, Imai Y, Imbriano C. Inomata M. Into T. Iovane V. Iovanna JL. Iozzo RV. Ip NY. Irazogui JE. Iribarren P, Isaka Y, Isakovic AJ, Ischiropoulos H, Isenberg JS, Ishaq M, Ishida H, Ishii I, Ishmael JE, Isidoro C, Isobe K, Isono E, Issazadeh-Navikas S, Itahana K, Itakura E, Ivanov AI, Iver AK, Izquierdo JM, Izumi Y, Izzo V, Jaattela M, Jaber N, Jackson DJ, Jackson WT, Jacob TG, Jacques TS, Jagannath C, Jain A, Jana NR, Jang BK, Jani A, Janji B, Jannig PR, Jansson PJ, Jean S, Jendrach M, Jeon JH, Jessen N, Jeung EB, Jia K, Jia L, Jiang H, Jiang H, Jiang L, Jiang T, Jiang X, Jiang X, Jiang X, Jiang Y, Jiang Y, Jimenez A, Jin C, Jin H, Jin L, Jin M, Jin S, Jinwal UK, Jo EK, Johansen T, Johnson DE, Johnson GV, Johnson JD, Jonasch E, Jones C, Joosten LA, Jordan J, Joseph AM, Joseph B, Joubert AM, Ju D, Ju J, Juan HF, Juenemann K, Juhasz G, Jung HS, Jung JU, Jung YK, Jungbluth H. Justice MJ. Jutten B. Kaakoush NO. Kaarniranta K. Kaasik A. Kabuta T. Kaeffer B. Kagedal K, Kahana A, Kajimura S, Kakhlon O, Kalia M, Kalvakolanu DV, Kamada Y, Kambas K, Kaminskyy VO, Kampinga HH, Kandouz M, Kang C, Kang R, Kang TC, Kanki T, Kanneganti TD, Kanno H, Kanthasamy AG, Kantorow M, Kaparakis-Liaskos M, Kapuy

O. Karantza V. Karim MR. Karmakar P. Kaser A. Kaushik S. Kawula T. Kavnar AM. Ke PY, Ke ZJ, Kehrl JH, Keller KE, Kemper JK, Kenworthy AK, Kepp O, Kern A, Kesari S, Kessel D, Ketteler R, Kettelhut Ido C, Khambu B, Khan MM, Khandelwal VK, Khare S, Kiang JG, Kiger AA, Kihara A, Kim AL, Kim CH, Kim DR, Kim DH, Kim EK, Kim HY, Kim HR, Kim JS, Kim JH, Kim JC, Kim JH, Kim KW, Kim MD, Kim MM, Kim PK, Kim SW, Kim SY, Kim YS, Kim Y, Kimchi A, Kimmelman AC, Kimura T, King JS, Kirkegaard K, Kirkin V, Kirshenbaum LA, Kishi S, Kitajima Y, Kitamoto K, Kitaoka Y, Kitazato K, Kley RA, Klimecki WT, Klinkenberg M, Klucken J, Knaevelsrud H, Knecht E, Knuppertz L, Ko JL, Kobayashi S, Koch JC, Koechlin-Ramonatxo C, Koenig U, Koh YH, Kohler K, Kohlwein SD, Koike M, Komatsu M, Kominami E, Kong D, Kong HJ, Konstantakou EG, Kopp BT, Korcsmaros T, Korhonen L, Korolchuk VI, Koshkina NV, Kou Y, Koukourakis MI, Koumenis C, Kovacs AL, Kovacs T, Kovacs WJ, Koya D, Kraft C, Krainc D, Kramer H, Kravic-Stevovic T, Krek W, Kretz-Remy C, Krick R, Krishnamurthy M, Kriston-Vizi J, Kroemer G, Kruer MC, Kruger R, Ktistakis NT, Kuchitsu K, Kuhn C, Kumar AP, Kumar A, Kumar A, Kumar D, Kumar D, Kumar R, Kumar S, Kundu M, Kung HJ, Kuno A, Kuo SH, Kuret J, Kurz T, Kwok T, Kwon TK, Kwon YT, Kyrmizi I, La Spada AR, Lafont F, Lahm T, Lakkaraju A, Lam T, Lamark T, Lancel S, Landowski TH, Lane DJ, Lane JD, Lanzi C, Lapaquette P, Lapierre LR, Laporte J, Laukkarinen J, Laurie GW, Lavandero S, Lavie L, LaVoie MJ, Law BY, Law HK, Law KB, Layfield R, Lazo PA, Le Cam L, Le Roch KG, Le Stunff H, Leardkamolkarn V, Lecuit M, Lee BH, Lee CH, Lee EF, Lee GM, Lee HJ, Lee H, Lee JK, Lee J, Lee JH, Lee JH, Lee M, Lee MS, Lee PJ, Lee SW, Lee SJ, Lee SJ, Lee SY, Lee SH, Lee SS, Lee SJ, Lee S, Lee YR, Lee YJ, Lee YH, Leeuwenburgh C, Lefort S, Legouis R, Lei J, Lei QY, Leib DA, Leibowitz G, Lekli I, Lemaire SD, Lemasters JJ, Lemberg MK, Lemoine A, Leng S, Lenz G, Lenzi P, Lerman LO, Lettieri Barbato D, Leu JI, Leung HY, Levine B, Lewis PA, Lezoualc'h F, Li C, Li F, Li FJ, Li J, Li K, Li L, Li M, Li M, Li Q, Li R, Li S, Li W, Li W, Li X, Li Y, Lian J, Liang C, Liang Q, Liao Y, Liberal J, Liberski PP, Lie P, Lieberman AP, Lim HJ, Lim KL, Lim K, Lima RT, Lin CS, Lin CF, Lin F, Lin F, Lin FC, Lin K, Lin KH, Lin PH, Lin T, Lin WW, Lin YS, Lin Y, Linden R, Lindholm D, Lindqvist LM, Lingor P, Linkermann A, Liotta LA, Lipinski MM, Lira VA, Lisanti MP, Liton PB, Liu B, Liu C, Liu CF, Liu F, Liu HJ, Liu J, Liu JJ, Liu JL, Liu K, Liu L, Liu L, Liu Q, Liu RY, Liu S, Liu S, Liu W, Liu XD, Liu X, Liu XH, Liu X, Liu X, Liu X, Liu Y, Liu Y, Liu Z, Liu Z, Liuzzi JP, Lizard G, Ljujic M, Lodhi IJ, Logue SE, Lokeshwar BL, Long YC, Lonial S, Loos B, Lopez-Otin C, Lopez-Vicario C, Lorente M, Lorenzi PL, Lorincz P, Los M, Lotze MT, Lovat PE, Lu B, Lu B, Lu J, Lu Q, Lu SM, Lu S, Lu Y, Luciano F, Luckhart S, Lucocq JM, Ludovico P, Lugea A, Lukacs NW, Lum JJ, Lund AH, Luo H, Luo J, Luo S, Luparello C, Lyons T, Ma J, Ma Y, Ma Y, Ma Z, Machado J, Machado-Santelli GM, Macian F, MacIntosh GC, MacKeigan JP, Macleod KF, MacMicking JD, MacMillan-Crow LA, Madeo F, Madesh M, Madrigal-Matute J, Maeda A, Maeda T, Maegawa G, Maellaro E, Maes H, Magarinos M, Maiese K, Maiti TK, Maiuri L, Maiuri MC, Maki CG, Malli R, Malorni W, Maloyan A, Mami-Chouaib F, Man N, Mancias JD, Mandelkow EM, Mandell MA, Manfredi AA, Manie SN, Manzoni C, Mao K, Mao Z, Mao ZW, Marambaud P, Marconi AM, Marelja Z, Marfe G, Margeta M, Margittai E, Mari M, Mariani FV, Marin C, Marinelli S, Marino G, Markovic I, Marguez R, Martelli AM, Martens S, Martin KR, Martin SJ, Martin S, Martin-Acebes MA, Martin-Sanz P, Martinand-Mari C, Martinet W, Martinez J, Martinez-Lopez N, Martinez-Outschoorn U, Martinez-Velazquez M, Martinez-Vicente M, Martins WK, Mashima H, Mastrianni JA, Matarese G, Matarrese P, Mateo R, Matoba S, Matsumoto N, Matsushita T, Matsuura A, Matsuzawa T, Mattson MP, Matus S, Maugeri N, Mauvezin C, Mayer A, Maysinger D, Mazzolini GD, McBraver MK, McCall K, McCormick C, McInerney GM, McIver SC, McKenna S, McMahon JJ, McNeish IA, Mechta-Grigoriou F, Medema JP, Medina DL, Megveri K, Mehrpour M, Mehta JL, Mei Y, Meier UC, Meijer AJ, Melendez A, Melino G, Melino S, de Melo EJ, Mena MA, Meneghini MD, Menendez JA, Menezes R, Meng L, Meng LH, Meng

S. Menghini R. Menko AS. Menna-Barreto RF. Menon MB. Meraz-Rios MA. Merla G. Merlini L, Merlot AM, Meryk A, Meschini S, Meyer JN, Mi MT, Miao CY, Micale L, Michaeli S, Michiels C, Migliaccio AR, Mihailidou AS, Mijaljica D, Mikoshiba K, Milan E, Miller-Fleming L, Mills GB, Mills IG, Minakaki G, Minassian BA, Ming XF, Minibayeva F, Minina EA, Mintern JD, Minucci S, Miranda-Vizuete A, Mitchell CH, Miyamoto S, Miyazawa K, Mizushima N, Mnich K, Mograbi B, Mohseni S, Moita LF, Molinari M, Molinari M, Moller AB, Mollereau B, Mollinedo F, Mongillo M, Monick MM, Montagnaro S, Montell C, Moore DJ, Moore MN, Mora-Rodriguez R, Moreira PI, Morel E, Morelli MB, Moreno S, Morgan MJ, Moris A, Moriyasu Y, Morrison JL, Morrison LA, Morselli E, Moscat J, Moseley PL, Mostowy S, Motori E, Mottet D, Mottram JC, Moussa CE, Mpakou VE, Mukhtar H, Mulcahy Levy JM, Muller S, Munoz-Moreno R, Munoz-Pinedo C, Munz C, Murphy ME, Murray JT, Murthy A, Mysorekar IU, Nabi IR, Nabissi M, Nader GA, Nagahara Y, Nagai Y, Nagata K, Nagelkerke A, Nagy P, Naidu SR, Nair S, Nakano H, Nakatogawa H, Nanjundan M, Napolitano G, Nagvi NI, Nardacci R, Narendra DP, Narita M, Nascimbeni AC, Natarajan R. Navegantes LC. Nawrocki ST. Nazarko TY. Nazarko VY. Neill T. Neri LM. Netea MG. Netea-Maier RT, Neves BM, Ney PA, Nezis IP, Nguyen HT, Nguyen HP, Nicot AS, Nilsen H, Nilsson P, Nishimura M, Nishino I, Niso-Santano M, Niu H, Nixon RA, Njar VC, Noda T, Noegel AA, Nolte EM, Norberg E, Norga KK, Noureini SK, Notomi S, Notterpek L, Nowikovsky K, Nukina N, Nurnberger T, O'Donnell VB, O'Donovan T, O'Dwyer PJ, Oehme I, Oeste CL, Ogawa M, Ogretmen B, Ogura Y, Oh YJ, Ohmuraya M, Ohshima T, Ojha R, Okamoto K, Okazaki T, Oliver FJ, Ollinger K, Olsson S, Orban DP, Ordonez P, Orhon I, Orosz L, O'Rourke EJ, Orozco H, Ortega AL, Ortona E, Osellame LD, Oshima J, Oshima S, Osiewacz HD, Otomo T, Otsu K, Ou JH, Outeiro TF, Ouyang DY, Ouyang H, Overholtzer M, Ozbun MA, Ozdinler PH, Ozpolat B, Pacelli C, Paganetti P, Page G, Pages G, Pagnini U, Pajak B, Pak SC, Pakos-Zebrucka K, Pakpour N, Palkova Z, Palladino F, Pallauf K, Pallet N, Palmieri M, Paludan SR, Palumbo C, Palumbo S, Pampliega O, Pan H, Pan W, Panaretakis T, Pandey A, Pantazopoulou A, Papackova Z, Papademetrio DL, Papassideri I, Papini A, Parajuli N, Pardo J, Parekh VV, Parenti G, Park JI, Park J, Park OK, Parker R, Parlato R, Parys JB, Parzych KR, Pasquet JM, Pasquier B, Pasumarthi KB, Patschan D, Patterson C, Pattingre S, Pattison S, Pause A, Pavenstadt H, Pavone F, Pedrozo Z, Pena FJ, Penalva MA, Pende M, Peng J, Penna F, Penninger JM, Pensalfini A, Pepe S, Pereira GJ, Pereira PC, Perez-de la Cruz V, Perez-Perez ME, Perez-Rodriguez D, Perez-Sala D, Perier C, Perl A, Perlmutter DH, Perrotta I, Pervaiz S, Pesonen M, Pessin JE, Peters GJ, Petersen M, Petrache I, Petrof BJ, Petrovski G, Phang JM, Piacentini M, Pierdominici M, Pierre P, Pierrefite-Carle V, Pietrocola F, Pimentel-Muinos FX, Pinar M, Pineda B, Pinkas-Kramarski R, Pinti M, Pinton P, Piperdi B, Piret JM, Platanias LC, Platta HW, Plowey ED, Poggeler S, Poirot M, Polcic P, Poletti A, Poon AH, Popelka H. Popova B. Poprawa I. Poulose SM. Poulton J. Powers SK. Powers T. Pozuelo-Rubio M, Prak K, Prange R, Prescott M, Priault M, Prince S, Proia RL, Proikas-Cezanne T, Prokisch H, Promponas VJ, Przyklenk K, Puertollano R, Pugazhenthi S, Puglielli L, Pujol A, Puyal J, Pyeon D, Qi X, Qian WB, Qin ZH, Qiu Y, Qu Z, Quadrilatero J, Quinn F, Raben N, Rabinowich H, Radogna F, Ragusa MJ, Rahmani M, Raina K, Ramanadham S, Ramesh R, Rami A, Randall-Demllo S, Randow F, Rao H, Rao VA, Rasmussen BB, Rasse TM, Ratovitski EA, Rautou PE, Ray SK, Razani B, Reed BH, Reggiori F, Rehm M, Reichert AS, Rein T, Reiner DJ, Reits E, Ren J, Ren X, Renna M, Reusch JE, Revuelta JL, Reves L, Rezaie AR, Richards RI, Richardson DR, Richetta C, Riehle MA, Rihn BH, Rikihisa Y, Riley BE, Rimbach G, Rippo MR, Ritis K, Rizzi F, Rizzo E, Roach PJ, Robbins J, Roberge M, Roca G, Roccheri MC, Rocha S, Rodrigues CM, Rodriguez CI, de Cordoba SR, Rodriguez-Muela N, Roelofs J, Rogov VV, Rohn TT, Rohrer B, Romanelli D, Romani L, Romano PS, Roncero MI, Rosa JL, Rosello A, Rosen KV, Rosenstiel P, Rost-Roszkowska M, Roth KA, Roue G, Rouis M, Rouschop KM, Ruan DT, Ruano D, Rubinsztein DC,

Rucker EB, 3rd, Rudich A, Rudolf E, Rudolf R, Ruegg MA, Ruiz-Roldan C, Ruparelia AA, Rusmini P, Russ DW, Russo GL, Russo G, Russo R, Rusten TE, Ryabovol V, Ryan KM, Ryter SW, Sabatini DM, Sacher M, Sachse C, Sack MN, Sadoshima J, Saftig P, Sagi-Eisenberg R, Sahni S, Saikumar P, Saito T, Saitoh T, Sakakura K, Sakoh-Nakatogawa M, Sakuraba Y, Salazar-Roa M, Salomoni P, Saluja AK, Salvaterra PM, Salvioli R, Samali A, Sanchez AM, Sanchez-Alcazar JA, Sanchez-Prieto R, Sandri M, Sanjuan MA, Santaguida S, Santambrogio L, Santoni G, Dos Santos CN, Saran S, Sardiello M, Sargent G, Sarkar P, Sarkar S, Sarrias MR, Sarwal MM, Sasakawa C, Sasaki M, Sass M, Sato K, Sato M, Satriano J, Savaraj N, Saveljeva S, Schaefer L, Schaible UE, Scharl M, Schatzl HM, Schekman R, Scheper W, Schiavi A, Schipper HM, Schmeisser H, Schmidt J, Schmitz I, Schneider BE, Schneider EM, Schneider JL, Schon EA, Schonenberger MJ, Schonthal AH, Schorderet DF, Schroder B, Schuck S, Schulze RJ, Schwarten M, Schwarz TL, Sciarretta S, Scotto K, Scovassi AI, Screaton RA, Screen M, Seca H, Sedej S, Segatori L, Segev N, Seglen PO, Segui-Simarro JM, Segura-Aguilar J, Seki E, Sell C, Seiliez I, Semenkovich CF, Semenza GL, Sen U, Serra AL, Serrano-Puebla A, Sesaki H, Setoguchi T, Settembre C, Shacka JJ, Shajahan-Haq AN, Shapiro IM, Sharma S, She H, Shen CK, Shen CC, Shen HM, Shen S, Shen W, Sheng R, Sheng X, Sheng ZH, Shepherd TG, Shi J, Shi Q, Shi Q, Shi Y, Shibutani S, Shibuya K, Shidoji Y, Shieh JJ, Shih CM, Shimada Y, Shimizu S, Shin DW, Shinohara ML, Shintani M, Shintani T, Shioi T, Shirabe K, Shiri-Sverdlov R, Shirihai O, Shore GC, Shu CW, Shukla D, Sibirny AA, Sica V, Sigurdson CJ, Sigurdsson EM, Sijwali PS, Sikorska B, Silveira WA, Silvente-Poirot S, Silverman GA, Simak J, Simmet T, Simon AK, Simon HU, Simone C, Simons M, Simonsen A, Singh R, Singh SV, Singh SK, Sinha D, Sinha S, Sinicrope FA, Sirko A, Sirohi K, Sishi BJ, Sittler A, Siu PM. Sivridis E. Skwarska A. Slack R. Slaninova I. Slavov N. Smaili SS. Smallev KS. Smith DR, Soenen SJ, Soleimanpour SA, Solhaug A, Somasundaram K, Son JH, Sonawane A, Song C, Song F, Song HK, Song JX, Song W, Soo KY, Sood AK, Soong TW, Soontornniyomkij V, Sorice M, Sotgia F, Soto-Pantoja DR, Sotthibundhu A, Sousa MJ, Spaink HP, Span PN, Spang A, Sparks JD, Speck PG, Spector SA, Spies CD, Springer W, Clair DS, Stacchiotti A, Staels B, Stang MT, Starczynowski DT, Starokadomskyy P, Steegborn C, Steele JW, Stefanis L, Steffan J, Stellrecht CM, Stenmark H, Stepkowski TM, Stern ST, Stevens C, Stockwell BR, Stoka V, Storchova Z, Stork B, Stratoulias V, Stravopodis DJ, Strnad P, Strohecker AM, Strom AL, Stromhaug P, Stulik J, Su YX, Su Z, Subauste CS, Subramaniam S, Sue CM, Suh SW, Sui X, Sukseree S, Sulzer D, Sun FL, Sun J, Sun J, Sun SY, Sun Y, Sun Y, Sun Y, Sundaramoorthy V, Sung J, Suzuki H, Suzuki K, Suzuki N, Suzuki T, Suzuki YJ, Swanson MS, Swanton C, Sward K, Swarup G, Sweeney ST, Sylvester PW, Szatmari Z, Szegezdi E, Szlosarek PW, Taegtmeyer H, Tafani M, Taillebourg E, Tait SW, Takacs-Vellai K, Takahashi Y. Takats S. Takemura G. Takigawa N. Talbot NJ. Tamagno E. Tamburini J. Tan CP, Tan L, Tan ML, Tan M, Tan YJ, Tanaka K, Tanaka M, Tang D, Tang D, Tang G, Tanida I, Tanji K, Tannous BA, Tapia JA, Tasset-Cuevas I, Tatar M, Tavassoly I, Tavernarakis N. Taylor A. Taylor GS. Taylor GA. Taylor JP. Taylor MJ. Tchetina EV. Tee AR, Teixeira-Clerc F, Telang S, Tencomnao T, Teng BB, Teng RJ, Terro F, Tettamanti G, Theiss AL, Theron AE, Thomas KJ, Thome MP, Thomes PG, Thorburn A, Thorner J, Thum T, Thumm M, Thurston TL, Tian L, Till A, Ting JP, Titorenko VI, Toker L, Toldo S, Tooze SA, Topisirovic I, Torgersen ML, Torosantucci L, Torriglia A, Torrisi MR, Tournier C, Towns R, Trajkovic V, Travassos LH, Triola G, Tripathi DN, Trisciuoglio D, Troncoso R, Trougakos IP, Truttmann AC, Tsai KJ, Tschan MP, Tseng YH, Tsukuba T, Tsung A, Tsvetkov AS, Tu S, Tuan HY, Tucci M, Tumbarello DA, Turk B, Turk V, Turner RF, Tveita AA, Tyagi SC, Ubukata M, Uchiyama Y, Udelnow A, Ueno T, Umekawa M, Umemiya-Shirafuji R, Underwood BR, Ungermann C, Ureshino RP, Ushioda R, Uversky VN, Uzcategui NL, Vaccari T, Vaccaro MI, Vachova L, Vakifahmetoglu-Norberg H, Valdor R,

Valente EM, Vallette F, Valverde AM, Van den Berghe G, Van Den Bosch L, van den Brink GR, van der Goot FG, van der Klei IJ, van der Laan LJ, van Doorn WG, van Egmond M, van Golen KL, Van Kaer L, van Lookeren Campagne M, Vandenabeele P, Vandenberghe W, Vanhorebeek I, Varela-Nieto I, Vasconcelos MH, Vasko R, Vavvas DG, Vega-Naredo I, Velasco G, Velentzas AD, Velentzas PD, Vellai T, Vellenga E, Vendelbo MH, Venkatachalam K, Ventura N, Ventura S, Veras PS, Verdier M, Vertessy BG, Viale A, Vidal M, Vieira HL, Vierstra RD, Vigneswaran N, Vij N, Vila M, Villar M, Villar VH, Villarroya J, Vindis C, Viola G, Viscomi MT, Vitale G, Vogl DT, Voitsekhovskaja OV, von Haefen C, von Schwarzenberg K, Voth DE, Vouret-Craviari V, Vuori K, Vyas JM, Waeber C, Walker CL, Walker MJ, Walter J, Wan L, Wan X, Wang B, Wang C, Wang CY, Wang C, Wang C, Wang C, Wang D, Wang F, Wang F, Wang G, Wang HJ, Wang H, Wang HG, Wang H, Wang HD, Wang J, Wang J, Wang M, Wang MQ, Wang PY, Wang P, Wang RC, Wang S, Wang TF, Wang X, Wang XJ, Wang XW, Wang X, Wang X, Wang Y, Wang Y, Wang Y, Wang YJ, Wang Y, Wang Y, Wang YT, Wang Y, Wang ZN, Wappner P, Ward C, Ward DM, Warnes G, Watada H, Watanabe Y, Watase K, Weaver TE, Weekes CD, Wei J, Weide T, Weihl CC, Weindl G, Weis SN, Wen L, Wen X, Wen Y, Westermann B, Weyand CM, White AR, White E, Whitton JL, Whitworth AJ, Wiels J, Wild F, Wildenberg ME, Wileman T, Wilkinson DS, Wilkinson S, Willbold D, Williams C, Williams K, Williamson PR, Winklhofer KF, Witkin SS, Wohlgemuth SE, Wollert T, Wolvetang EJ, Wong E, Wong GW, Wong RW, Wong VK, Woodcock EA, Wright KL, Wu C, Wu D, Wu GS, Wu J, Wu J, Wu M, Wu M, Wu S, Wu WK, Wu Y, Wu Z, Xavier CP, Xavier RJ, Xia GX, Xia T, Xia W, Xia Y, Xiao H, Xiao J, Xiao S, Xiao W, Xie CM, Xie Z, Xie Z, Xilouri M, Xiong Y, Xu C, Xu C, Xu F, Xu H, Xu H, Xu J, Xu J, Xu J, Xu L, Xu X, Xu Y, Xu Y, Xu ZX, Xu Z, Xue Y, Yamada T, Yamamoto A, Yamanaka K, Yamashina S, Yamashiro S, Yan B, Yan B, Yan X, Yan Z, Yanagi Y, Yang DS, Yang JM, Yang L, Yang M, Yang PM, Yang P, Yang Q, Yang W, Yang WY, Yang X, Yang Y, Yang Y, Yang Z, Yang Z, Yao MC, Yao PJ, Yao X, Yao Z, Yao Z, Yasui LS, Ye M, Yedvobnick B, Yeganeh B, Yeh ES, Yeyati PL, Yi F, Yi L, Yin XM, Yip CK, Yoo YM, Yoo YH, Yoon SY, Yoshida K, Yoshimori T, Young KH, Yu H, Yu JJ, Yu JT, Yu J, Yu L, Yu WH, Yu XF, Yu Z, Yuan J, Yuan ZM, Yue BY, Yue J, Yue Z, Zacks DN, Zacksenhaus E, Zaffaroni N, Zaglia T, Zakeri Z, Zecchini V, Zeng J, Zeng M, Zeng Q, Zervos AS, Zhang DD, Zhang F, Zhang G, Zhang GC, Zhang H, Zhang H, Zhang H, Zhang H, Zhang J, Zhang J, Zhang J, Zhang J, Zhang JP, Zhang L, Zhang L, Zhang L, Zhang L, Zhang MY, Zhang X, Zhang XD, Zhang Y, Zhang Y, Zhang Y, Zhang Y, Zhang Y, Zhao M, Zhao WL, Zhao X, Zhao YG, Zhao Y, Zhao Y, Zhao YX, Zhao Z, Zhao ZJ, Zheng D, Zheng XL, Zheng X, Zhivotovsky B, Zhong Q, Zhou GZ, Zhou G, Zhou H, Zhou SF, Zhou XJ, Zhu H, Zhu H, Zhu WG, Zhu W, Zhu XF, Zhu Y, Zhuang SM, Zhuang X, Ziparo E, Zois CE, Zoladek T, Zong WX, Zorzano A & Zughaier SM (2016) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). Autophagy 12(1):1-222.

- Köck J, Nassal M, MacNelly S, Baumert TF, Blum HE & von Weizsäcker F (2001) Efficient infection of primary tupaia hepatocytes with purified human and woolly monkey hepatitis B virus. *J. Virol.* 75(11):5084-5089.
- Koh C, Canini L, Dahari H, Zhao X, Uprichard SL, Haynes-Williams V, Winters MA, Subramanya G, Cooper SL, Pinto P, Wolff EF, Bishop R, Ai Thanda Han M, Cotler SJ, Kleiner DE, Keskin O, Idilman R, Yurdaydin C, Glenn JS & Heller T (2015) Oral prenylation inhibition with lonafarnib in chronic hepatitis D infection: a proof-of-concept randomised, doubleblind, placebo-controlled phase 2A trial. *Lancet Infect. Dis.* 15(10):1167-1174.
- Koh C, Da BL & Glenn JS (2019) HBV/HDV Coinfection: A Challenge for Therapeutics. *Clin. Liver Dis.* 23(3):557-572.

- Komla-Soukha I & Sureau C (2006) A tryptophan-rich motif in the carboxyl terminus of the small envelope protein of hepatitis B virus is central to the assembly of hepatitis delta virus particles. *J Virol* 80(10):4648-4655.
- Kouwaki T, Fukushima Y, Daito T, Sanada T, Yamamoto N, Mifsud EJ, Leong CR, Tsukiyama-Kohara K, Kohara M, Matsumoto M, Seya T & Oshiumi H (2016) Extracellular Vesicles Including Exosomes Regulate Innate Immune Responses to Hepatitis B Virus Infection. *Front. Immunol.* 7:335.
- Kramvis A & Kew MC (1998) Structure and function of the encapsidation signal of hepadnaviridae. *J. Viral Hepat.* 5(6):357-367.
- Kroemer G, Marino G & Levine B (2010) Autophagy and the integrated stress response. *Mol. Cell* 40(2):280-293.
- Ktistakis NT & Tooze SA (2016) Digesting the Expanding Mechanisms of Autophagy. *Trends Cell Biol.* 26(8):624-635.
- Kullak-Ublick GA, Beuers U & Paumgartner G (1996) Molecular and functional characterization of bile acid transport in human hepatoblastoma HepG2 cells. *Hepatology* 23(5):1053-1060.
- Kuo MY, Chao M & Taylor J (1989) Initiation of replication of the human hepatitis delta virus genome from cloned DNA: role of delta antigen. *J. Virol.* 63(5):1945-1950.
- Kuo MY, Sharmeen L, Dinter-Gottlieb G & Taylor J (1988) Characterization of self-cleaving RNA sequences on the genome and antigenome of human hepatitis delta virus. *J. Virol.* 62(12):4439-4444.
- Kyei GB, Dinkins C, Davis AS, Roberts E, Singh SB, Dong C, Wu L, Kominami E, Ueno T, Yamamoto A, Federico M, Panganiban A, Vergne I & Deretic V (2009) Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *J. Cell Biol.* 186(2):255-268.
- 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(8):1715-1720.
- Lagana A, Russo F, Veneziano D, Bella SD, Giugno R, Pulvirenti A, Croce CM & Ferro A (2013) Extracellular circulating viral microRNAs: current knowledge and perspectives. *Front Genet* 4:120.
- 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(10).
- Lai MM (1995) The molecular biology of hepatitis delta virus. Annu. Rev. Biochem. 64:259-286.
- Lam AJ, St-Pierre F, Gong Y, Marshall JD, Cranfill PJ, Baird MA, McKeown MR, Wiedenmann J, Davidson MW, Schnitzer MJ, Tsien RY & Lin MZ (2012) Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins. *Nat. Methods* 9(10):1005-1012.
- Lambert C, Doring T & Prange R (2007) Hepatitis B virus maturation is sensitive to functional inhibition of ESCRT-III, Vps4, and gamma 2-adaptin. *J. Virol.* 81(17):9050-9060.
- Lamontagne RJ, Bagga S & Bouchard MJ (2016) Hepatitis B virus molecular biology and pathogenesis. *Hepatoma Res* 2:163-186.

- Lazinski DW & Taylor JM (1995) Intracellular cleavage and ligation of hepatitis delta virus genomic RNA: regulation of ribozyme activity by cis-acting sequences and host factors. *J. Virol.* 69(2):1190-1200.
- Le Guerhier F, Pichoud C, Guerret S, Chevallier M, Jamard C, Hantz O, Li XY, Chen SH, King I, Trépo C, Cheng YC & Zoulim F (2000) Characterization of the antiviral effect of 2',3'dideoxy-2', 3'-didehydro-beta-L-5-fluorocytidine in the duck hepatitis B virus infection model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44(1):111-122.
- Le Lay S, Martinez MC & Andriantsitohaina R (2018) [Extracellular vesicles as biomarkers and bioeffectors of metabolic syndrome]. *Med. Sci. (Paris)* 34(11):936-943.
- Lee CH, Chang SC, Wu CH & Chang MF (2001) A novel chromosome region maintenance 1independent nuclear export signal of the large form of hepatitis delta antigen that is required for the viral assembly. *J. Biol. Chem.* 276(11):8142-8148.
- Lee CZ, Chen PJ, Lai MM & Chen DS (1994) Isoprenylation of large hepatitis delta antigen is necessary but not sufficient for hepatitis delta virus assembly. *Virology* 199(1):169-175.
- Lee CZ & Sheu JC (2008) Histone H1e interacts with small hepatitis delta antigen and affects hepatitis delta virus replication. *Virology* 375(1):197-204.
- Lee MS & Kim YJ (2007) Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu. Rev. Biochem.* 76:447-480.
- Lempp FA & Urban S (2017) Hepatitis Delta Virus: Replication Strategy and Upcoming Therapeutic Options for a Neglected Human Pathogen. *Viruses* 9(7).
- Levine B (2005) Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell* 120(2):159-162.
- Levy G, Bomze D, Heinz S, Ramachandran SD, Noerenberg A, Cohen M, Shibolet O, Sklan E, Braspenning J & Nahmias Y (2015) Long-term culture and expansion of primary human hepatocytes. *Nat. Biotechnol.* 33(12):1264-1271.
- Lewellyn EB & Loeb DD (2007) Base pairing between cis-acting sequences contributes to template switching during plus-strand DNA synthesis in human hepatitis B virus. *J. Virol.* 81(12):6207-6215.
- Li H, Yan L, Shi Y, Lv D, Shang J, Bai L & Tang H (2020a) Hepatitis B Virus Infection: Overview. Hepatitis Virus Infection Molecular Virology to Antiviral Drugs, Hong Tang (Édit.) Springer, 2019/11/20 Ed Vol 1179. p 1-16.
- Li J, Liu K, Liu Y, Xu Y, Zhang F, Yang H, Liu J, Pan T, Chen J, Wu M, Zhou X & Yuan Z (2013) Exosomes mediate the cell-to-cell transmission of IFN-alpha-induced antiviral activity. *Nat. Immunol.* 14(8):793-803.
- Li J, Liu Y, Wang Z, Liu K, Wang Y, Liu J, Ding H & Yuan Z (2011) Subversion of cellular autophagy machinery by hepatitis B virus for viral envelopment. *J. Virol.* 85(13):6319-6333.
- Li L, Kim E, Yuan H, Inoki K, Goraksha-Hicks P, Schiesher RL, Neufeld TP & Guan KL (2010) Regulation of mTORC1 by the Rab and Arf GTPases. *J. Biol. Chem.* 285(26):19705-19709.
- Li S, Li S, Wu S & Chen L (2019) Exosomes Modulate the Viral Replication and Host Immune Responses in HBV Infection. *Biomed Res Int* 2019:2103943.

- Li X, He S & Ma B (2020b) Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Mol. Cancer* 19(1):12.
- Li YJ, Stallcup MR & Lai MM (2004) Hepatitis delta virus antigen is methylated at arginine residues, and methylation regulates subcellular localization and RNA replication. *J. Virol.* 78(23):13325-13334.
- Liaw YF (2009) HBeAg seroconversion as an important end point in the treatment of chronic hepatitis B. *Hepatol. Int.* 3(3):425-433.
- Lien JM, Petcu DJ, Aldrich CE & Mason WS (1987) Initiation and termination of duck hepatitis B virus DNA synthesis during virus maturation. *J. Virol.* 61(12):3832-3840.
- Likhitsup A & Lok AS (2019) Understanding the Natural History of Hepatitis B Virus Infection and the New Definitions of Cure and the Endpoints of Clinical Trials. *Clin. Liver Dis.* 23(3):401-416.
- Lin Y, Wu C, Wang X, Kemper T, Squire A, Gunzer M, Zhang J, Chen X & Lu M (2019a) Hepatitis B virus is degraded by autophagosome-lysosome fusion mediated by Rab7 and related components. *Protein Cell* 10(1):60-66.
- Lin Y, Wu C, Wang X, Liu S, Kemper T, Li F, Squire A, Zhu Y, Zhang J, Chen X & Lu M (2019b) Synaptosomal-associated protein 29 is required for the autophagic degradation of hepatitis B virus. *FASEB J.* 33(5):6023-6034.
- Lippai M & Lőw P (2014) The role of the selective adaptor p62 and ubiquitin-like proteins in autophagy. *BioMed research international* 2014.
- Liu B, Fang M, Hu Y, Huang B, Li N, Chang C, Huang R, Xu X, Yang Z, Chen Z & Liu W (2014) Hepatitis B virus X protein inhibits autophagic degradation by impairing lysosomal maturation. *Autophagy* 10(3):416-430.
- Liu Y & Levine B (2015) Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death Differ.* 22(3):367-376.
- Loeb DD, Hirsch RC & Ganem D (1991) Sequence-independent RNA cleavages generate the primers for plus strand DNA synthesis in hepatitis B viruses: implications for other reverse transcribing elements. *EMBO J.* 10(11):3533-3540.
- Lok AS, Weller IV, Karayiannis P, Brown D, Fowler MJ, Monjardino J, Thomas HC & Sherlock S (1984) Thrice weekly lymphoblastoid interferon is effective in inhibiting hepatitis B virus replication. *Liver* 4(1):45-49.
- Lorincz P & Juhasz G (2019) Autophagosome-Lysosome Fusion. J. Mol. Biol. 10.1016/j.jmb.2019.10.028.
- Lotvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzas EI, Di Vizio D, Gardiner C, Gho YS, Kurochkin IV, Mathivanan S, Quesenberry P, Sahoo S, Tahara H, Wauben MH, Witwer KW & Thery C (2014) Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. J *Extracell Vesicles* 3:26913.
- Lucifora J (2008) Etude de la réplication du virus de l'hépatite B: Réponse intracellulaire à l'infection virale. Phd (Claude Bernard Lyon 1).
- Lucifora J & Delphin M (2020) Current knowledge on Hepatitis Delta Virus replication. *Antiviral Res.* 179:104812.

- Lugini L, Cecchetti S, Huber V, Luciani F, Macchia G, Spadaro F, Paris L, Abalsamo L, Colone M, Molinari A, Podo F, Rivoltini L, Ramoni C & Fais S (2012) Immune surveillance properties of human NK cell-derived exosomes. *J. Immunol.* 189(6):2833-2842.
- Luo GX, Chao M, Hsieh SY, Sureau C, Nishikura K & Taylor J (1990) A specific base transition occurs on replicating hepatitis delta virus RNA. *J. Virol.* 64(3):1021-1027.
- Lussignol M, Queval C, Bernet-Camard MF, Cotte-Laffitte J, Beau I, Codogno P & Esclatine A (2013) The herpes simplex virus 1 Us11 protein inhibits autophagy through its interaction with the protein kinase PKR. *J. Virol.* 87(2):859-871.
- Lütgehetmann M, Mancke LV, Volz T, Helbig M, Allweiss L, Bornscheuer T, Pollok JM, Lohse AW, Petersen J, Urban S & Dandri M (2012) Humanized chimeric uPA mouse model for the study of hepatitis B and D virus interactions and preclinical drug evaluation. *Hepatology* 55(3):685-694.
- Ma Y, Galluzzi L, Zitvogel L & Kroemer G (2013) Autophagy and cellular immune responses. *Immunity* 39(2):211-227.
- Mabit H, Vons C, Dubanchet S, Capel F, Franco D & Petit MA (1996) Primary cultured normal human hepatocytes for hepatitis B virus receptor studies. *J. Hepatol.* 24(4):403-412.
- MacNaughton TB, Gowans EJ, McNamara SP & Burrell CJ (1991) Hepatitis delta antigen is necessary for access of hepatitis delta virus RNA to the cell transcriptional machinery but is not part of the transcriptional complex. *Virology* 184(1):387-390.
- Macnaughton TB & Lai MM (2006) HDV RNA replication: ancient relic or primer? *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 307:25-45.
- Macnaughton TB & Lai MMC (2002a) Genomic but Not Antigenomic Hepatitis Delta Virus RNA Is Preferentially Exported from the Nucleus Immediately after Synthesis and Processing. J. Virol. 76(8):3928-3935.
- Macnaughton TB & Lai MMC (2002b) Large Hepatitis Delta Antigen Is Not a Suppressor of Hepatitis Delta Virus RNA Synthesis once RNA Replication Is Established. *J. Virol.* 76(19):9910-9919.
- Macovei A, Radulescu C, Lazar C, Petrescu S, Durantel D, Dwek RA, Zitzmann N & Nichita NB (2010) Hepatitis B virus requires intact caveolin-1 function for productive infection in HepaRG cells. *J. Virol.* 84(1):243-253.
- Madison MN & Okeoma CM (2015) Exosomes: Implications in HIV-1 Pathogenesis. *Viruses* 7(7):4093-4118.
- Maeda S, Otomo C & Otomo T (2019) The autophagic membrane tether ATG2A transfers lipids between membranes. *Elife* 8.
- Mak LY, Seto WK, Fung J & Yuen MF (2020) Use of HBsAg quantification in the natural history and treatment of chronic hepatitis B. *Hepatol. Int.* 14(1):35-46.
- Mao J, Lin E, He L, Yu J, Tan P & Zhou Y (2019) Autophagy and Viral Infection. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1209:55-78.
- Mao Y, Da L, Tang H, Yang J, Lei Y, Tiollais P, Li T & Zhao M (2011) Hepatitis B virus X protein reduces starvation-induced cell death through activation of autophagy and inhibition of mitochondrial apoptotic pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 415(1):68-74.

- MARK Y.-P. KUO, MEI CHAO & TAYLOR AJ (1989) Initiation of Replication of the Human Hepatitis Delta Virus Genome from Cloned DNA: Role of Delta Antigen. *J. Virol.* 63:1945-1950.
- Martinot-Peignoux M, Boyer N, Colombat M, Akremi R, Pham BN, Ollivier S, Castelnau C, Valla D, Degott C & Marcellin P (2002) Serum hepatitis B virus DNA levels and liver histology in inactive HBsAg carriers. *J. Hepatol.* 36(4):543-546.
- Masciopinto F, Giovani C, Campagnoli S, Galli-Stampino L, Colombatto P, Brunetto M, Yen TS, Houghton M, Pileri P & Abrignani S (2004) Association of hepatitis C virus envelope proteins with exosomes. *Eur. J. Immunol.* 34(10):2834-2842.
- Mason WS, Liu C, Aldrich CE, Litwin S & Yeh MM (2010) Clonal expansion of normal-appearing human hepatocytes during chronic hepatitis B virus infection. *J. Virol.* 84(16):8308-8315.
- Masood U & John S (2020) Hepatitis D. *StatPearls,* StatPearls Publishing LLC., Treasure Island FL.
- Mateo R, Nagamine CM, Spagnolo J, Mendez E, Rahe M, Gale M, Jr., Yuan J & Kirkegaard K (2013) Inhibition of cellular autophagy deranges dengue virion maturation. *J. Virol.* 87(3):1312-1321.
- Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G & Thery C (2019) Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat. Cell Biol.* 21(1):9-17.
- Mathivanan S, Fahner CJ, Reid GE & Simpson RJ (2012) ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Res.* 40(Database issue):D1241-1244.
- Mathivanan S, Ji H & Simpson RJ (2010) Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J. Proteomics* 73(10):1907-1920.
- Mathivanan S & Simpson RJ (2009) ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics* 9(21):4997-5000.
- Mauvezin C & Neufeld TP (2015) Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosomelysosome fusion. *Autophagy* 11(8):1437-1438.
- McEwan DG (2017) Host-pathogen interactions and subversion of autophagy. *Essays Biochem.* 61(6):687-697.
- McEwan DG, Popovic D, Gubas A, Terawaki S, Suzuki H, Stadel D, Coxon FP, Miranda de Stegmann D, Bhogaraju S, Maddi K, Kirchof A, Gatti E, Helfrich MH, Wakatsuki S, Behrends C, Pierre P & Dikic I (2015) PLEKHM1 regulates autophagosome-lysosome fusion through HOPS complex and LC3/GABARAP proteins. *Mol. Cell* 57(1):39-54.
- McLean JE, Wudzinska A, Datan E, Quaglino D & Zakeri Z (2011) Flavivirus NS4A-induced autophagy protects cells against death and enhances virus replication. *J. Biol. Chem.* 286(25):22147-22159.
- McMahon BJ, Alward WL, Hall DB, Heyward WL, Bender TR, Francis DP & Maynard JE (1985) Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. *J. Infect. Dis.* 151(4):599-603.
- Mehrbod P, Ande SR, Alizadeh J, Rahimizadeh S, Shariati A, Malek H, Hashemi M, Glover KKM, Sher AA, Coombs KM & Ghavami S (2019) The roles of apoptosis, autophagy and unfolded protein response in arbovirus, influenza virus, and HIV infections. *Virulence* 10(1):376-413.

- Mei Chao, Sen-Yung Hsieh & Taytor AJ (1990) Role of Two Forms of Hepatitis Delta Virus Antigen a Evidence for a
- Mechanism of Self-Limiting Genome Replication. J. Virol. 64:5066-5069.
- Meier A, Mehrle S, Weiss TS, Mier W & Urban S (2013) Myristoylated PreS1-domain of the hepatitis B virus L-protein mediates specific binding to differentiated hepatocytes. *Hepatology* 58(1):31-42.
- Melegari M, Scaglioni PP & Wands JR (1998) Hepatitis B virus mutants associated with 3TC and famciclovir administration are replication defective. *Hepatology* 27(2):628-633.
- Meng B, Ip NC, Prestwood LJ, Abbink TE & Lever AM (2015) Evidence that the endosomal sorting complex required for transport-II (ESCRT-II) is required for efficient human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) production. *Retrovirology* 12:72.
- Mentha N, Clement S, Negro F & Alfaiate D (2019) A review on hepatitis D: From virology to new therapies. *J Adv Res* 17:3-15.
- Mizushima N (2010) The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22(2):132-139.
- Mizushima N, Yoshimori T & Levine B (2010) Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 140(3):313-326.
- Mizushima N, Yoshimori T & Ohsumi Y (2011) The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 27:107-132.
- Modahl LE & Lai MM (2000) The large delta antigen of hepatitis delta virus potently inhibits genomic but not antigenomic RNA synthesis: a mechanism enabling initiation of viral replication. *J. Virol.* 74(16):7375-7380.
- Mohamud Y, Shi J, Qu J, Poon T, Xue YC, Deng H, Zhang J & Luo H (2018) Enteroviral Infection Inhibits Autophagic Flux via Disruption of the SNARE Complex to Enhance Viral Replication. *Cell Rep.* 22(12):3292-3303.
- Mohd-Ismail NK, Lim Z, Gunaratne J & Tan YJ (2019) Mapping the Interactions of HBV cccDNA with Host Factors. *Int. J. Mol. Sci.* 20(17):1-18.
- Molnar-Kimber KL, Summers JW & Mason WS (1984) Mapping of the cohesive overlap of duck hepatitis B virus DNA and of the site of initiation of reverse transcription. *J. Virol.* 51(1):181-191.
- Momen-Heravi F, Saha B, Kodys K, Catalano D, Satishchandran A & Szabo G (2015) Increased number of circulating exosomes and their microRNA cargos are potential novel biomarkers in alcoholic hepatitis. *J. Transl. Med.* 13:261.
- Mori Y, Koike M, Moriishi E, Kawabata A, Tang H, Oyaizu H, Uchiyama Y & Yamanishi K (2008) Human herpesvirus-6 induces MVB formation, and virus egress occurs by an exosomal release pathway. *Traffic* 9(10):1728-1742.
- Moriarty AM, Hoyer BH, Shih JW, Gerin JL & Hamer DH (1981) Expression of the hepatitis B virus surface antigen gene in cell culture by using a simian virus 40 vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78(4):2606-2610.
- Morikawa K, Suda G & Sakamoto N (2016) Viral life cycle of hepatitis B virus: Host factors and druggable targets. *Hepatol. Res.* 46(9):871-877.

- Mu JJ, Tsay YG, Juan LJ, Fu TF, Huang WH, Chen DS & Chen PJ (2004) 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* 319(1):60-70.
- Mulcahy LA, Pink RC & Carter DR (2014) Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles* 3.
- Munich S, Sobo-Vujanovic A, Buchser WJ, Beer-Stolz D & Vujanovic NL (2012) Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF superfamily ligands. *Oncoimmunology* 1(7):1074-1083.
- Nagashima S, Jirintai S, Takahashi M, Kobayashi T, Tanggis, Nishizawa T, Kouki T, Yashiro T & Okamoto H (2014) Hepatitis E virus egress depends on the exosomal pathway, with secretory exosomes derived from multivesicular bodies. *J. Gen. Virol.* 95(Pt 10):2166-2175.
- Nakamura S & Yoshimori T (2017) New insights into autophagosome-lysosome fusion. *J. Cell Sci.* 130(7):1209-1216.
- Nassal M (2015) HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut* 64(12):1972-1984.
- 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(6):1357-1363.
- Nassal M & Rieger A (1996) A bulged region of the hepatitis B virus RNA encapsidation signal contains the replication origin for discontinuous first-strand DNA synthesis. *J. Virol.* 70(5):2764-2773.
- Negro F (2014) Hepatitis D virus coinfection and superinfection. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 4(11):a021550.
- Neurath AR, Adamowicz P, Kent SB, Riottot MM, Strick N, Parker K, Offensperger W, Petit MA, Wahl S, Budkowska A & et al. (1986) Characterization of monoclonal antibodies specific for the pre-S2 region of the hepatitis B virus envelope protein. *Mol. Immunol.* 23(9):991-997.
- Newbold JE, Xin H, Tencza M, Sherman G, Dean J, Bowden S & Locarnini S (1995) The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes. *J. Virol.* 69(6):3350-3357.
- Nguyen MH, Wong G, Gane E, Kao JH & Dusheiko G (2020) Hepatitis B Virus: Advances in Prevention, Diagnosis, and Therapy. *Clin. Microbiol. Rev.* 33(2):e00046-00019.
- Ni Y, Lempp FA, Mehrle S, Nkongolo S, Kaufman C, Fälth M, Stindt J, Königer C, Nassal M, Kubitz R, Sültmann H & Urban S (2014) Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology* 146(4):1070-1083.
- Nolte-'t Hoen EN, Buschow SI, Anderton SM, Stoorvogel W & Wauben MH (2009) Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1. *Blood* 113(9):1977-1981.
- Noordeen F, Scougall CA, Grosse A, Qiao Q, Ajilian BB, Reaiche-Miller G, Finnie J, Werner M, Broering R, Schlaak JF, Vaillant A & Jilbert AR (2015) Therapeutic Antiviral Effect of the Nucleic Acid Polymer REP 2055 against Persistent Duck Hepatitis B Virus Infection. *PLoS One* 10(11):e0140909.

- Nowag H, Guhl B, Thriene K, Romao S, Ziegler U, Dengjel J & Munz C (2014) Macroautophagy Proteins Assist Epstein Barr Virus Production and Get Incorporated Into the Virus Particles. *EBioMedicine* 1(2-3):116-125.
- O'Malley B & Lazinski DW (2005) Roles of carboxyl-terminal and farnesylated residues in the functions of the large hepatitis delta antigen. *J. Virol.* 79(2):1142-1153.
- Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, Murakami T, Taniguchi M, Tanii I, Yoshinaga K, Shiosaka S, Hammarback JA, Urano F & Imaizumi K (2006) Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cell. Biol.* 26(24):9220-9231.
- Ohsumi Y & Mizushima N (2004) Two ubiquitin-like conjugation systems essential for autophagy. Semin. Cell Dev. Biol. 15(2):231-236.
- Orsi A, Polson HE & Tooze SA (2010) Membrane trafficking events that partake in autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22(2):150-156.
- Orsi A, Razi M, Dooley HC, Robinson D, Weston AE, Collinson LM & Tooze SA (2012) Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. *Mol. Biol. Cell* 23(10):1860-1873.
- Orvedahl A, MacPherson S, Sumpter R, Jr., Tallóczy Z, Zou Z & Levine B (2010) Autophagy protects against Sindbis virus infection of the central nervous system. *Cell Host Microbe* 7(2):115-127.
- Orvedahl A, Sumpter R, Jr., Xiao G, Ng A, Zou Z, Tang Y, Narimatsu M, Gilpin C, Sun Q, Roth M, Forst CV, Wrana JL, Zhang YE, Luby-Phelps K, Xavier RJ, Xie Y & Levine B (2011) Image-based genome-wide siRNA screen identifies selective autophagy factors. *Nature* 480(7375):113-117.
- Osawa T, Kotani T, Kawaoka T, Hirata E, Suzuki K, Nakatogawa H, Ohsumi Y & Noda NN (2019) Atg2 mediates direct lipid transfer between membranes for autophagosome formation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 26(4):281-288.
- Ostapchuk P, Hearing P & Ganem D (1994) A dramatic shift in the transmembrane topology of a viral envelope glycoprotein accompanies hepatitis B viral morphogenesis. *EMBO J*. 13(5):1048-1057.
- Paludan C, Schmid D, Landthaler M, Vockerodt M, Kube D, Tuschl T & Münz C (2005) Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science* 307(5709):593-596.
- Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M & Johnstone RM (1985) Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. J. Cell Biol. 101(3):942-948.
- Pang S, Yu D, An DS, Baldwin GC, Xie Y, Poon B, Chow YH, Park NH & Chen IS (2000) Human immunodeficiency virus Env-independent infection of human CD4(-) cells. J. Virol. 74(23):10994-11000.
- Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Overvatn A, Bjorkoy G & Johansen T (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. J. Biol. Chem. 282(33):24131-24145.
- Parzych KR & Klionsky DJ (2014) An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid. Redox Signal.* 20(3):460-473.

- Pasek M, Goto T, Gilbert W, Zink B, Schaller H, MacKay P, Leadbetter G & Murray K (1979) Hepatitis B virus genes and their expression in E. coli. *Nature* 282(5739):575-579.
- Patient R, Hourioux C & Roingeard P (2008) Morphogenèse du virus de l'hépatite B. *Virologie* 12(6):453-464.
- Patient R, Hourioux C & Roingeard P (2009) Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles. *Cell. Microbiol.* 11(11):1561-1570.
- Patient R, Hourioux C, Sizaret PY, Trassard S, Sureau C & Roingeard P (2007) Hepatitis B virus subviral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking. *J. Virol.* 81(8):3842-3851.
- Patzer EJ, Nakamura GR, Simonsen CC, Levinson AD & Brands R (1986) Intracellular assembly and packaging of hepatitis B surface antigen particles occur in the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* 58(3):884-892.
- Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, van Eijndhoven MA, Hopmans ES, Lindenberg JL, de Gruijl TD, Wurdinger T & Middeldorp JM (2010) Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107(14):6328-6333.
- Peltekian C, Gordien E, Garreau F, Meas-Yedid V, Soussan P, Willams V, Chaix ML, Olivo-Marin JC, Brechot C & Kremsdorf D (2005) Human MxA protein participates to the interferonrelated inhibition of hepatitis B virus replication in female transgenic mice. *J. Hepatol.* 43(6):965-972.
- Perez-Vargas J, Amirache F, Boson B, Mialon C, Freitas N, Sureau C, Fusil F & Cosset FL (2019) Enveloped viruses distinct from HBV induce dissemination of hepatitis D virus in vivo. *Nat Commun* 10(1):2098.
- Perfumo S, Amicone L, Colloca S, Giorgio M, Pozzi L & Tripodi M (1992) Recognition efficiency of the hepatitis B virus polyadenylation signals is tissue specific in transgenic mice. *J. Virol.* 66(11):6819-6823.
- Pollicino T, Raffa G, Santantonio T, Gaeta GB, Iannello G, Alibrandi A, Squadrito G, Cacciola I, Calvi C, Colucci G, Levrero M & Raimondo G (2011) Replicative and transcriptional activities of hepatitis B virus in patients coinfected with hepatitis B and hepatitis delta viruses. *J. Virol.* 85(1):432-439.
- Ponzetto A, Cote PJ, Popper H, Hoyer BH, London WT, Ford EC, Bonino F, Purcell RH & Gerin JL (1984) Transmission of the hepatitis B virus-associated delta agent to the eastern woodchuck. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81(7):2208-2212.
- Prange R (2012) Host factors involved in hepatitis B virus maturation, assembly, and egress. *Med. Microbiol. Immunol.* 201(4):449-461.
- Prange R & Streeck RE (1995) Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins. *EMBO J.* 14(2):247-256.
- Prince AM (1968) An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 60(3):814-821.
- Prince AM, Lee DH & Brotman B (2001) Infectivity of blood from PCR-positive, HBsAg-negative, anti-HBs-positive cases of resolved hepatitis B infection. *Transfusion* 41(3):329-332.
- Puigvehi M, Moctezuma-Velazquez C, Villanueva A & Llovet JM (2019) The oncogenic role of hepatitis delta virus in hepatocellular carcinoma. *JHEP Rep* 1(2):120-130.

- 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(17):9849-9854.
- Rahman MA, Patters BJ, Kodidela S & Kumar S (2019) Extracellular Vesicles: Intercellular Mediators in Alcohol-Induced Pathologies. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 10.1007/s11481-019-09848-z.
- Rall LB, Standring DN, Laub O & Rutter WJ (1983) Transcription of hepatitis B virus by RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* 3(10):1766-1773.
- Ramakrishnaiah V, Thumann C, Fofana I, Habersetzer F, Pan Q, de Ruiter PE, Willemsen R, Demmers JA, Stalin Raj V, Jenster G, Kwekkeboom J, Tilanus HW, Haagmans BL, Baumert TF & van der Laan LJ (2013) Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7.5 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110(32):13109-13113.
- Raposo G & Stoorvogel W (2013) Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 200(4):373-383.
- Ravikumar B, Imarisio S, Sarkar S, O'Kane CJ & Rubinsztein DC (2008) Rab5 modulates aggregation and toxicity of mutant huntingtin through macroautophagy in cell and fly models of Huntington disease. *J. Cell Sci.* 121(Pt 10):1649-1660.
- Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, Puri C & Rubinsztein DC (2010) Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat. Cell Biol.* 12(8):747-757.
- Rawla P, Sunkara T, Muralidharan P & Raj JP (2018) Update in global trends and aetiology of hepatocellular carcinoma. *Contemp Oncol (Pozn)* 22(3):141-150.
- Rechavi O, Erlich Y, Amram H, Flomenblit L, Karginov FV, Goldstein I, Hannon GJ & Kloog Y (2009) Cell contact-dependent acquisition of cellular and viral nonautonomously encoded small RNAs. *Genes Dev.* 23(16):1971-1979.
- Record M, Carayon K, Poirot M & Silvente-Poirot S (2014) Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiologies. *Biochim. Biophys. Acta* 1841(1):108-120.
- Reid CE & Lazinski DW (2000) A host-specific function is required for ligation of a wide variety of ribozyme-processed RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97(1):424-429.
- Ren H, Elgner F, Jiang B, Himmelsbach K, Medvedev R, Ploen D & Hildt E (2016) The Autophagosomal SNARE Protein Syntaxin 17 Is an Essential Factor for the Hepatitis C Virus Life Cycle. *J. Virol.* 90(13):5989-6000.
- Ribeiro RM, Lo A & Perelson AS (2002) Dynamics of hepatitis B virus infection. *Microbes Infect* 4(8):829-835.
- Rizzetto M (2016) The adventure of delta. *Liver Int* 36 Suppl 1:135-140.
- Rizzetto M, Canese MG, Arico S, Crivelli O, Trepo C, Bonino F & Verme G (1977) Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut* 18(12):997-1003.
- Rizzetto M, Canese MG, Gerin JL, London WT, Sly DL & Purcell RH (1980a) Transmission of the hepatitis B virus-associated delta antigen to chimpanzees. *J. Infect. Dis.* 141(5):590-602.

- Rizzetto M, Hoyer B, Canese MG, Shih JW, Purcell RH & Gerin JL (1980b) delta Agent: association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77(10):6124-6128.
- Robinson M, Schor S, Barouch-Bentov R & Einav S (2018) Viral journeys on the intracellular highways. *Cell. Mol. Life Sci.* 75(20):3693-3714.
- Robinson WS, Clayton DA & Greenman RL (1974) DNA of a human hepatitis B virus candidate. *J. Virol.* 14(2):384-391.
- Romanov J, Walczak M, Ibiricu I, Schuchner S, Ogris E, Kraft C & Martens S (2012) Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. *EMBO J.* 31(22):4304-4317.
- Rossner MT (1992) Review: hepatitis B virus X-gene product: a promiscuous transcriptional activator. *J. Med. Virol.* 36(2):101-117.
- Rost M, Mann S, Lambert C, Doring T, Thome N & Prange R (2006) Gamma-adaptin, a novel ubiquitin-interacting adaptor, and Nedd4 ubiquitin ligase control hepatitis B virus maturation. *J. Biol. Chem.* 281(39):29297-29308.
- Rubinsztein DC, Shpilka T & Elazar Z (2012) Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Curr. Biol.* 22(1):R29-34.
- Ryu WS, Bayer M & Taylor J (1992) Assembly of hepatitis delta virus particles. *J. Virol.* 66(4):2310-2315.
- Ryu WS, Netter HJ, Bayer M & Taylor J (1993) Ribonucleoprotein complexes of hepatitis delta virus. *J. Virol.* 67(6):3281-3287.
- Sagnier S, Daussy CF, Borel S, Robert-Hebmann V, Faure M, Blanchet FP, Beaumelle B, Biard-Piechaczyk M & Espert L (2015) Autophagy restricts HIV-1 infection by selectively degrading Tat in CD4+ T lymphocytes. *J. Virol.* 89(1):615-625.
- Sarin SK, Kumar M, Lau GK, Abbas Z, Chan HL, Chen CJ, Chen DS, Chen HL, Chen PJ, Chien RN, Dokmeci AK, Gane E, Hou JL, Jafri W, Jia J, Kim JH, Lai CL, Lee HC, Lim SG, Liu CJ, Locarnini S, Al Mahtab M, Mohamed R, Omata M, Park J, Piratvisuth T, Sharma BC, Sollano J, Wang FS, Wei L, Yuen MF, Zheng SS & Kao JH (2016) Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update. *Hepatol. Int.* 10(1):1-98.
- Sato S, Cornillez-Ty C & Lazinski DW (2004) By inhibiting replication, the large hepatitis delta antigen can indirectly regulate amber/W editing and its own expression. *J. Virol.* 78(15):8120-8134.
- Saxton RA & Sabatini DM (2017) mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 169(2):361-371.
- Schaller H & Fischer M (1991) Transcriptional control of hepadnavirus gene expression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 168:21-39.
- Schaper M, Rodriguez-Frias F, Jardi R, Tabernero D, Homs M, Ruiz G, Quer J, Esteban R & Buti M (2010) Quantitative longitudinal evaluations of hepatitis delta virus RNA and hepatitis B virus DNA shows a dynamic, complex replicative profile in chronic hepatitis B and D. *J. Hepatol.* 52(5):658-664.
- Schmitz A, Schwarz A, Foss M, Zhou L, Rabe B, Hoellenriegel J, Stoeber M, Pante N & Kann M (2010) Nucleoporin 153 arrests the nuclear import of hepatitis B virus capsids in the nuclear basket. *PLoS Pathog.* 6(1):e1000741.

- Schorey JS, Cheng Y, Singh PP & Smith VL (2015) Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO Rep* 16(1):24-43.
- Schulze-Bergkamen H, Untergasser A, Dax A, Vogel H, Büchler P, Klar E, Lehnert T, Friess H, Büchler MW, Kirschfink M, Stremmel W, Krammer PH, Müller M & Protzer U (2003) Primary human hepatocytes--a valuable tool for investigation of apoptosis and hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 38(6):736-744.
- Seeger C, Ganem D & Varmus HE (1986) Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science* 232(4749):477-484.
- Seeger C & Mason WS (2000) Hepatitis B virus biology. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64(1):51-68.
- Seignères B, Pichoud C, Martin P, Furman P, Trépo C & Zoulim F (2002) Inhibitory activity of dioxolane purine analogs on wild-type and lamivudine-resistant mutants of hepadnaviruses. *Hepatology* 36(3):710-722.
- Sells MA, Chen ML & Acs G (1987) Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84(4):1005-1009.
- Shamur MM, Peri-Naor R, Mayer R & Vaillant A (2017) Interaction of nucleic acid polymers with the large and small forms of hepatitis delta antigen protein. *Hepatology* 66:504A.
- Sharma V, Verma S, Seranova E, Sarkar S & Kumar D (2018) Selective Autophagy and Xenophagy in Infection and Disease. *Front Cell Dev Biol* 6:147.
- Shaul Y (1992) Regulation of hepadnavirus transcription. *Molecular biology of the hepatitis B virus. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla*:193-211.
- Shen J, Chen X, Hendershot L & Prywes R (2002) ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev. Cell* 3(1):99-111.
- Shen J, Huang CK, Yu H, Shen B, Zhang Y, Liang Y, Li Z, Feng X, Zhao J, Duan L & Cai X (2017) The role of exosomes in hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J. Cell. Mol. Med.* 21(5):986-992.
- Sheraz M, Cheng J, Tang L, Chang J & Guo JT (2019) Cellular DNA Topoisomerases Are Required for the Synthesis of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA. *J. Virol.* 93(11).
- Shih KN & Lo SJ (2001) The HDV large-delta antigen fused with GFP remains functional and provides for studying its dynamic distribution. *Virology* 285(1):138-152.
- Shirvani-Dastgerdi E & Tacke F (2015) Molecular interactions between hepatitis B virus and delta virus. *World J Virol* 4(2):36-41.
- Shpilka T, Mizushima N & Elazar Z (2012) Ubiquitin-like proteins and autophagy at a glance. *J. Cell Sci.* 125(Pt 10):2343-2348.
- Shrivastava S, Bhanja Chowdhury J, Steele R, Ray R & Ray RB (2012) Hepatitis C virus upregulates Beclin1 for induction of autophagy and activates mTOR signaling. *J. Virol.* 86(16):8705-8712.
- Shrivastava S, Devhare P, Sujijantarat N, Steele R, Kwon YC, Ray R & Ray RB (2016) Knockdown of Autophagy Inhibits Infectious Hepatitis C Virus Release by the Exosomal Pathway. *J. Virol.* 90(3):1387-1396.

- Simonsen CC & Levinson AD (1983) Analysis of processing and polyadenylation signals of the hepatitis B virus surface antigen gene by using simian virus 40-hepatitis B virus chimeric plasmids. *Mol. Cell. Biol.* 3(12):2250-2258.
- Sir D, Chen WL, Choi J, Wakita T, Yen TS & Ou JH (2008) Induction of incomplete autophagic response by hepatitis C virus via the unfolded protein response. *Hepatology* 48(4):1054-1061.
- Sir D, Kuo CF, Tian Y, Liu HM, Huang EJ, Jung JU, Machida K & Ou JH (2012) Replication of hepatitis C virus RNA on autophagosomal membranes. *J. Biol. Chem.* 287(22):18036-18043.
- Sir D, Tian Y, Chen WL, Ann DK, Yen TS & Ou JH (2010) The early autophagic pathway is activated by hepatitis B virus and required for viral DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107(9):4383-4388.
- Slagle BL, Andrisani OM, Bouchard MJ, Lee CG, Ou JH & Siddiqui A (2015) Technical standards for hepatitis B virus X protein (HBx) research. *Hepatology* 61(4):1416-1424.
- Slagle BL & Bouchard MJ (2016) Hepatitis B Virus X and Regulation of Viral Gene Expression. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6(3):a021402.
- Stremersch S, De Smedt SC & Raemdonck K (2016) Therapeutic and diagnostic applications of extracellular vesicles. *J. Control. Release* 244(Pt B):167-183.
- Su H & Yee JK (1992) Regulation of hepatitis B virus gene expression by its two enhancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89(7):2708-2712.
- Su WC, Chao TC, Huang YL, Weng SC, Jeng KS & Lai MM (2011) Rab5 and class III phosphoinositide 3-kinase Vps34 are involved in hepatitis C virus NS4B-induced autophagy. *J. Virol.* 85(20):10561-10571.
- Summers J & Mason WS (1982) Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 29(2):403-415.
- Summers J, O'Connell A & Millman I (1975) Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72(11):4597-4601.
- Sun D, Wen X, Wang M, Mao S, Cheng A, Yang X, Jia R, Chen S, Yang Q, Wu Y, Zhu D, Liu M, Zhao X, Zhang S, Wang Y, Xu Z, Chen Z, Zhu L, Luo Q, Liu Y, Yu Y, Zhang L & Chen X (2019) Apoptosis and Autophagy in Picornavirus Infection. *Front. Microbiol.* 10:2032.
- Sun D, Wu R, Li P & Yu L (2020) Phase Separation in Regulation of Aggrephagy. *J. Mol. Biol.* 432(1):160-169.
- Sureau C, Guerra B & Lee H (1994) The middle hepatitis B virus envelope protein is not necessary for infectivity of hepatitis delta virus. *J. Virol.* 68(6):4063-4066.
- Sureau C & Negro F (2016) The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis. *J. Hepatol.* 64(1 Suppl):S102-S116.
- Sureau C, Romet-Lemonne JL, Mullins JI & Essex M (1986) Production of hepatitis B virus by a differentiated human hepatoma cell line after transfection with cloned circular HBV DNA. *Cell* 47(1):37-47.
- Sureau C & Salisse J (2013) A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus a-determinant. *Hepatology* 57(3):985-994.

- Sureau C, Taylor J, Chao M, Eichberg JW & Lanford RE (1989) Cloned hepatitis delta virus cDNA is infectious in the chimpanzee. *J. Virol.* 63(10):4292-4297.
- Taguwa S, Kambara H, Fujita N, Noda T, Yoshimori T, Koike K, Moriishi K & Matsuura Y (2011) Dysfunction of autophagy participates in vacuole formation and cell death in cells replicating hepatitis C virus. *J. Virol.* 85(24):13185-13194.
- Takahashi K, Imai M, Gotanda T, Sano T, Oinuma A, Mishiro S, Miyakawa Y & Mayumi M (1980) Hepatitis B e antigen polypeptides isolated from sera of individuals infected with hepatitis B virus: comparison with HBeAg polypeptide derived from Dane particles. *J. Gen. Virol.* 50(1):49-57.
- Tallóczy Z, Virgin HWt & Levine B (2006) PKR-dependent autophagic degradation of herpes simplex virus type 1. *Autophagy* 2(1):24-29.
- Tang H, Da L, Mao Y, Li Y, Li D, Xu Z, Li F, Wang Y, Tiollais P, Li T & Zhao M (2009) Hepatitis B virus X protein sensitizes cells to starvation-induced autophagy via up-regulation of beclin 1 expression. *Hepatology* 49(1):60-71.
- Tang L, Sheraz M, McGrane M, Chang J & Guo JT (2019) DNA Polymerase alpha is essential for intracellular amplification of hepatitis B virus covalently closed circular DNA. *PLoS Pathog.* 15(4):e1007742.
- Tanida I, Fukasawa M, Ueno T, Kominami E, Wakita T & Hanada K (2009) Knockdown of autophagy-related gene decreases the production of infectious hepatitis C virus particles. *Autophagy* 5(7):937-945.
- Tavanez JP, Cunha C, Silva MC, David E, Monjardino J & Carmo-Fonseca M (2002) Hepatitis delta virus ribonucleoproteins shuttle between the nucleus and the cytoplasm. *RNA* 8(5):637-646.
- Taylor JM (2006) Structure and replication of hepatitis delta virus RNA. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 307:1-23.
- Terrault NA, Lok ASF, McMahon BJ, Chang KM, Hwang JP, Jonas MM, Brown RS, Jr., Bzowej NH & Wong JB (2018a) Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance. *Hepatology* 67(4):1560-1599.
- Terrault NA, Lok ASF, McMahon BJ, Chang KM, Hwang JP, Jonas MM, Brown RS, Jr., Bzowej NH & Wong JB (2018b) Update on Prevention, Diagnosis, and Treatment of Chronic Hepatitis B: AASLD 2018 Hepatitis B Guidance. *Clin Liver Dis (Hoboken)* 12(1):33-34.
- Thery C, Duban L, Segura E, Veron P, Lantz O & Amigorena S (2002a) Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Immunol.* 3(12):1156-1162.
- Thery C, Zitvogel L & Amigorena S (2002b) Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* 2(8):569-579.
- Tian Y, Sir D, Kuo CF, Ann DK & Ou JH (2011) Autophagy required for hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J. Virol.* 85(24):13453-13456.
- Tooze SA & Dikic I (2016) Autophagy Captures the Nobel Prize. Cell 167(6):1433-1435.
- Tooze SA & Yoshimori T (2010) The origin of the autophagosomal membrane. *Nat. Cell Biol.* 12(9):831-835.
- Treinin M & Laub O (1987) Identification of a promoter element located upstream from the hepatitis B virus X gene. *Mol. Cell. Biol.* 7(1):545-548.

- Tseng CH, Cheng TS, Shu CY, Jeng KS & Lai MM (2010) Modification of small hepatitis delta virus antigen by SUMO protein. *J. Virol.* 84(2):918-927.
- Tseng CH, Jeng KS & Lai MM (2008) Transcription of subgenomic mRNA of hepatitis delta virus requires a modified hepatitis delta antigen that is distinct from antigenomic RNA synthesis. *J. Virol.* 82(19):9409-9416.
- Urban S, Bartenschlager R, Kubitz R & Zoulim F (2014) Strategies to inhibit entry of HBV and HDV into hepatocytes. *Gastroenterology* 147(1):48-64.
- Urbanelli L, Buratta S, Tancini B, Sagini K, Delo F, Porcellati S & Emiliani C (2019) The Role of Extracellular Vesicles in Viral Infection and Transmission. *Vaccines (Basel)* 7(3).
- Vaillant A (2016) Nucleic acid polymers: Broad spectrum antiviral activity, antiviral mechanisms and optimization for the treatment of hepatitis B and hepatitis D infection. *Antiviral Res.* 133:32-40.
- Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ & Lotvall JO (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9(6):654-659.
- Valaydon ZS & Locarnini SA (2017) The virological aspects of hepatitis B. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 31(3):257-264.
- Valenzuela P, Gray P, Quiroga M, Zaldivar J, Goodman HM & Rutter WJ (1979) Nucleotide sequence of the gene coding for the major protein of hepatitis B virus surface antigen. *Nature* 280(5725):815-819.
- Valera MS, de Armas-Rillo L, Barroso-Gonzalez J, Ziglio S, Batisse J, Dubois N, Marrero-Hernandez S, Borel S, Garcia-Exposito L, Biard-Piechaczyk M, Paillart JC & Valenzuela-Fernandez A (2015) The HDAC6/APOBEC3G complex regulates HIV-1 infectiveness by inducing Vif autophagic degradation. *Retrovirology* 12:53.
- Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Gutierrez-Vazquez C, Sanchez-Madrid F & Mittelbrunn M (2014) Sorting it out: regulation of exosome loading. *Semin. Cancer Biol.* 28:3-13.
- Villeneuve JP, Condreay LD, Willems B, Pomier-Layrargues G, Fenyves D, Bilodeau M, Leduc R, Peltekian K, Wong F, Margulies M & Heathcote EJ (2000) Lamivudine treatment for decompensated cirrhosis resulting from chronic hepatitis B. *Hepatology* 31(1):207-210.
- Volz T, Allweiss L, Ben MM, Warlich M, Lohse AW, Pollok JM, Alexandrov A, Urban S, Petersen J, Lütgehetmann M & Dandri M (2013) The entry inhibitor Myrcludex-B efficiently blocks intrahepatic virus spreading in humanized mice previously infected with hepatitis B virus. J. Hepatol. 58(5):861-867.
- Votteler J & Sundquist WI (2013) Virus budding and the ESCRT pathway. *Cell Host Microbe* 14(3):232-241.
- Walczak M & Martens S (2013) Dissecting the role of the Atg12-Atg5-Atg16 complex during autophagosome formation. *Autophagy* 9(3):424-425.
- Walker SA & Ktistakis NT (2019) Autophagosome Biogenesis Machinery. J. Mol. Biol. 10.1016/j.jmb.2019.10.027.
- Walter E, Keist R, Niederöst B, Pult I & Blum HE (1996) Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo. *Hepatology* 24(1):1-5.
- Wang J, Chen J, Liu Y, Zeng X, Wei M, Wu S, Xiong Q, Song F, Yuan X, Xiao Y, Cao Y, Li C, Chen L, Guo M, Shi YB, Sun G & Guo D (2019) Hepatitis B Virus Induces Autophagy to

Promote its Replication by the Axis of miR-192-3p-XIAP Through NF kappa B Signaling. *Hepatology* 69(3):974-992.

- Wang J, Kang R, Huang H, Xi X, Wang B, Wang J & Zhao Z (2014) Hepatitis C virus core protein activates autophagy through EIF2AK3 and ATF6 UPR pathway-mediated MAP1LC3B and ATG12 expression. *Autophagy* 10(5):766-784.
- Wang KS, Choo QL, Weiner AJ, Ou JH, Najarian RC, Thayer RM, Mullenbach GT, Denniston KJ, Gerin JL & Houghton M (1986) Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (delta) viral genome. *Nature* 323(6088):508-514.
- Wang L, Tian Y & Ou JH (2015) HCV induces the expression of Rubicon and UVRAG to temporally regulate the maturation of autophagosomes and viral replication
- PLoS Pathog. 11(3):e1004764.
- Wang P, Guo QS, Wang ZW & Qian HX (2013) HBx induces HepG-2 cells autophagy through PI3K/Akt-mTOR pathway. *Mol. Cell. Biochem.* 372(1-2):161-168.
- Wang X, Lin Y, Kemper T, Chen J, Yuan Z, Liu S, Zhu Y, Broering R & Lu M (2020) AMPK and Akt/mTOR signalling pathways participate in glucose-mediated regulation of hepatitis B virus replication and cellular autophagy. *Cell. Microbiol.* 22(2):e13131.
- Wang Y, Wu MC, Sham JS, Tai LS, Fang Y, Wu WQ, Xie D & Guan XY (2002) Different expression of hepatitis B surface antigen between hepatocellular carcinoma and its surrounding liver tissue, studied using a tissue microarray. *J. Pathol.* 197(5):610-616.
- Wang YC, Huang CR, Chao M & Lo SJ (2009) The C-terminal sequence of the large hepatitis delta antigen is variable but retains the ability to bind clathrin. *Virol J.* 6:31.
- Watanabe T, Sorensen EM, Naito A, Schott M, Kim S & Ahlquist P (2007) Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* U. S. A. 104(24):10205-10210.
- Wedemeyer H, Hardtke S & Manns MP (2013) Treatment of hepatitis Delta. *Clinical Liver Disease* 2(6):237-239.
- Wei Y, Tavis JE & Ganem D (1996) Relationship between viral DNA synthesis and virion envelopment in hepatitis B viruses. *J. Virol.* 70(9):6455-6458.
- Weiner AJ, Choo QL, Wang KS, Govindarajan S, Redeker AG, Gerin JL & Houghton M (1988) A single antigenomic open reading frame of the hepatitis delta virus encodes the epitope(s) of both hepatitis delta antigen polypeptides p24 delta and p27 delta. *J. Virol.* 62(2):594-599.

Wilkinson S (2020) Emerging Principles of Selective ER Autophagy. J. Mol. Biol. 432(1):185-205.

- Will H, Reiser W, Weimer T, Pfaff E, Büscher M, Sprengel R, Cattaneo R & Schaller H (1987) Replication strategy of human hepatitis B virus. *J. Virol.* 61(3):904-911.
- Williams V, Brichler S, Radjef N, Lebon P, Goffard A, Hober D, Fagard R, Kremsdorf D, Deny P & Gordien E (2009) Hepatitis delta virus proteins repress hepatitis B virus enhancers and activate the alpha/beta interferon-inducible MxA gene. *J. Gen. Virol.* 90(Pt 11):2759-2767.
- Wolf P (1967) The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *Br. J. Haematol.* 13(3):269-288.
- Wong WY, Lee MM, Chan BD, Kam RK, Zhang G, Lu AP & Tai WC (2016) Proteomic profiling of dextran sulfate sodium induced acute ulcerative colitis mice serum exosomes and their immunomodulatory impact on macrophages. *Proteomics* 16(7):1131-1145.

- Woo ASJ, Kwok R & Ahmed T (2017) Alpha-interferon treatment in hepatitis B. *Ann Transl Med* 5(7):159.
- World Health Organisation (2019a) Hépatite D. WHO,
- World Health Organisation (2019b) Hepatitis B.
- Wu CC, Chen YS, Cao L, Chen XW & Lu MJ (2018) Hepatitis B virus infection: Defective surface antigen expression and pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* 24(31):3488-3499.
- Wu YT, Tan HL, Shui G, Bauvy C, Huang Q, Wenk MR, Ong CN, Codogno P & Shen HM (2010) Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. J. Biol. Chem. 285(14):10850-10861.
- Xia YP, Chang MF, Wei D, Govindarajan S & Lai MM (1990) Heterogeneity of hepatitis delta antigen. *Virology* 178(1):331-336.
- Xie N, Yuan K, Zhou L, Wang K, Chen HN, Lei Y, Lan J, Pu Q, Gao W, Zhang L, Shen G, Li Q, Xiao H, Tang H, Xiang R, He M, Feng P, Nice EC, Wei Y, Zhang H, Yang J & Huang C (2016) PRKAA/AMPK restricts HBV replication through promotion of autophagic degradation. *Autophagy* 12(9):1507-1520.
- Xu J, Camfield R & Gorski SM (2018) The interplay between exosomes and autophagy partners in crime. *J. Cell Sci.* 131(15):1-11.
- Yamaguchi Y, Filipovska J, Yano K, Furuya A, Inukai N, Narita T, Wada T, Sugimoto S, Konarska MM & Handa H (2001) Stimulation of RNA polymerase II elongation by hepatitis delta antigen. *Science* 293(5527):124-127.
- Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, Huang Y, Qi Y, Peng B, Wang H, Fu L, Song M, Chen P, Gao W, Ren B, Sun Y, Cai T, Feng X, Sui J & Li W (2012) Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* 1:e00049.
- Yan J, Kuroyanagi H, Kuroiwa A, Matsuda Y-i, Tokumitsu H, Tomoda T, Shirasawa T & Muramatsu M-a (1998) Identification of Mouse ULK1, a Novel Protein Kinase Structurally Related toC. elegansUNC-51. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246(1):222-227.
- Yang B, Ming X, Cao C, Laing B, Yuan A, Porter MA, Hull-Ryde EA, Maddry J, Suto M, Janzen WP & Juliano RL (2015a) High-throughput screening identifies small molecules that enhance the pharmacological effects of oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 43(4):1987-1996.
- Yang FM, Friedrichs WE, Cupples RL, Bonifacio MJ, Sanford JA, Horton WA & Bowman BH (1990) Human ceruloplasmin. Tissue-specific expression of transcripts produced by alternative splicing. *J. Biol. Chem.* 265(18):10780-10785.
- Yang H, Fu Q, Liu C, Li T, Wang Y, Zhang H, Lu X, Sang X, Zhong S, Huang J & Mao Y (2015b) Hepatitis B virus promotes autophagic degradation but not replication in autophagosome. *Biosci. Trends* 9(2):111-116.
- Yang L, Ye S, Zhao X, Ji L, Zhang Y, Zhou P, Sun J, Guan Y, Han Y, Ni C, Hu X, Liu W, Wang H, Zhou B & Huang J (2018) Molecular Characterization of HBV DNA Integration in Patients with Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *J. Cancer* 9(18):3225-3235.
- Yang Q, Liu TT, Lin H, Zhang M, Wei J, Luo WW, Hu YH, Zhong B, Hu MM & Shu HB (2017a) TRIM32-TAX1BP1-dependent selective autophagic degradation of TRIF negatively regulates TLR3/4-mediated innate immune responses. *PLoS Pathog.* 13(9):e1006600.

- Yang X, Li H, Sun H, Fan H, Hu Y, Liu M, Li X & Tang H (2017b) Hepatitis B Virus-Encoded MicroRNA Controls Viral Replication. *J. Virol.* 91(10):1-18.
- Yang Y, Han Q, Hou Z, Zhang C, Tian Z & Zhang J (2017c) Exosomes mediate hepatitis B virus (HBV) transmission and NK-cell dysfunction. *Cell. Mol. Immunol.* 14(5):465-475.
- Yang Y & Klionsky DJ (2020) Autophagy and disease: unanswered questions. *Cell Death Differ.* 10.1038/s41418-019-0480-9.
- Yao Z, Qiao Y, Li X, Chen J, Ding J, Bai L, Shen F, Shi B, Liu J, Peng L, Li J & Yuan Z (2018) Exosomes Exploit the Virus Entry Machinery and Pathway To Transmit Alpha Interferon-Induced Antiviral Activity. *J. Virol.* 92(24):1-42.
- Yeganeh B, Rezaei Moghadam A, Alizadeh J, Wiechec E, Alavian SM, Hashemi M, Geramizadeh B, Samali A, Bagheri Lankarani K, Post M, Peymani P, Coombs KM & Ghavami S (2015) Hepatitis B and C virus-induced hepatitis: Apoptosis, autophagy, and unfolded protein response. *World J. Gastroenterol.* 21(47):13225-13239.
- Yen TB (1993) Regulation of hepatitis B virus gene expression. Semin. Virol. Elsevier, p 33-42.
- Yim HJ & Lok AS (2006) Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology* 43(2 Suppl 1):S173-181.
- Yip CK, Murata K, Walz T, Sabatini DM & Kang SA (2010) Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. *Mol. Cell* 38(5):768-774.
- Yokosuka O, Omata M, Imazeki F, Ito Y & Okuda K (1986) Hepatitis B virus RNA transcripts and DNA in chronic liver disease. *N. Engl. J. Med.* 315(19):1187-1192.
- Yordy B, Tal MC, Hayashi K, Arojo O & Iwasaki A (2013) Autophagy and selective deployment of Atg proteins in antiviral defense. *Int. Immunol.* 25(1):1-10.
- Yoshii SR & Mizushima N (2017) Monitoring and Measuring Autophagy. Int. J. Mol. Sci. 18(9).
- Yuen MF, Schwabe C, Tanwandee T, Jin Y, Gao L, Zhou X, Das S, Wang Y, Lemenuel-Diot A & Cosson V (2019) RO7049389, a core protein allosteric modulator, demonstrates robust decline in HBV DNA and HBV RNA in chronic HBV infected patients. *The International Liver Congress.* (Vienna Austria, Levin J (Édit.) EASL 2019.
- Zeyen L & Prange R (2018) Host Cell Rab GTPases in Hepatitis B Virus Infection. *Front Cell Dev Biol* 6:154.
- Zhang HT, Chen GG, Hu BG, Zhang ZY, Yun JP, He ML & Lai PB (2014) Hepatitis B virus x protein induces autophagy via activating death-associated protein kinase. *J. Viral Hepat.* 21(9):642-649.
- Zhang L (2020) Autophagy in hepatitis B or C virus infection: An incubator and a potential therapeutic target. *Life Sci.* 242:117206.
- Zhang W, Jiang X, Bao J, Wang Y, Liu H & Tang L (2018) Exosomes in Pathogen Infections: A Bridge to Deliver Molecules and Link Functions. *Front. Immunol.* 9:90.
- Zhang X, Hou J & Lu M (2013) Regulation of hepatitis B virus replication by epigenetic mechanisms and microRNAs. *Front Genet* 4:202.
- Zhang Y, Liu Y, Liu H & Tang WH (2019) Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci.* 9:19.

- Zhao K, Wu C, Yao Y, Cao L, Zhang Z, Yuan Y, Wang Y, Pei R, Chen J, Hu X, Zhou Y, Lu M & Chen X (2017) Ceruloplasmin inhibits the production of extracellular hepatitis B virions by targeting its middle surface protein. *J. Gen. Virol.* 98(6):1410-1421.
- Zhong L, Shu W, Dai W, Gao B & Xiong S (2017) Reactive Oxygen Species-Mediated c-Jun NH2-Terminal Kinase Activation Contributes to Hepatitis B Virus X Protein-Induced Autophagy via Regulation of the Beclin-1/Bcl-2 Interaction. *J. Virol.* 91(15):1-14.
- Zhou C, Zhong W, Zhou J, Sheng F, Fang Z, Wei Y, Chen Y, Deng X, Xia B & Lin J (2012) Monitoring autophagic flux by an improved tandem fluorescent-tagged LC3 (mTagRFPmWasabi-LC3) reveals that high-dose rapamycin impairs autophagic flux in cancer cells. *Autophagy* 8(8):1215-1226.
- Zhou DX & Yen TS (1991) The hepatitis B virus S promoter comprises A CCAAT motif and two initiation regions. *J. Biol. Chem.* 266(34):23416-23421.
- Zhou T, Jin M, Ding Y, Zhang Y, Sun Y, Huang S, Xie Q, Xu C & Cai W (2016) Hepatitis B virus dampens autophagy maturation via negative regulation of Rab7 expression. *Biosci. Trends* 10(4):244-250.
- Zoncu R, Efeyan A & Sabatini DM (2011) mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12(1):21-35.
- Zoulim F (2004) Mechanism of viral persistence and resistance to nucleoside and nucleotide analogs in chronic hepatitis B virus infection. *Antiviral Res.* 64(1):1-15.
- Zoulim F, Dannaoui E, Borel C, Hantz O, Lin TS, Liu SH, Trépo C & Cheng YC (1996) 2',3'dideoxy-beta-L-5-fluorocytidine inhibits duck hepatitis B virus reverse transcription and suppresses viral DNA synthesis in hepatocytes, both in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40(2):448-453.
- Zoulim F & Seeger C (1994) Reverse transcription in hepatitis B viruses is primed by a tyrosine residue of the polymerase. *J. Virol.* 68(1):6-13.
- Zoulim F, Yogaratnam J, Vandenbossche JJ, Moscalu L, Streinu-Cercel A, Lenz O, Bourgeois S, Buti M, Pascasio JM & Sarrazin C (2018) Safety, pharmacokinetics and antiviral activity of a novel hepatitis B virus (HBV) capsid assembly modulator, JNJ-56136379, in patients with chronic hepatitis B (CHB). *The Liver Meeting.* (San Francisco, Levin J (Édit.) AASLD 2018, p 47A-48A.
- Zuccola HJ, Rozzelle JE, Lemon SM, Erickson BW & Hogle JM (1998) Structural basis of the oligomerization of hepatitis delta antigen. *Structure* 6(7):821-830.

LISTE DE PUBLICATIONS

Hepatitis Delta Virus Alters the Autophagy Process to Promote Its Genome Replication.

<u>Khabir M</u>, Aliche AZ, Sureau C, Blanchet M, Labonté P. (2020) Journal of Virololgy. doi : 10.1128/JVI.01936-19. Print 2020 Jan 31.

Exosomes mediate HDV transmission between hepatocytes

Khabir M, Blanchet M, Sureau C, Bukong TN, Labonté P. (2020) En préparation.

LC3B is not recruited along with the autophagy elongation complex (ATG5-12/16L1) at HCV replication site and is dispensable for viral replication.

Fahmy AM, <u>Khabir M</u>, Blanchet M, Labonté P. (2018) PLoS One doi: 10.1371/journal.pone.0205189. eCollection 2018.

Revealing Drug Self-Associations into Nano-Entities

Dlim MM, Shahout FS, <u>Khabir MK</u>, Labonté PP, LaPlante SR, (2019) ACS Omega. doi: 10.1021/acsomega.9b00667. eCollection 2019 May 31.

ANNEXE

LC3B is not recruited along with the autophagy elongation complex (ATG5-12/16L1) at HCV replication site and is dispensable for viral replication.

Fahmy AM, <u>Khabir M</u>, Blanchet M, Labonté P. (2018) PLoS One doi: 10.1371/journal.pone.0205189. eCollection 2018.

Investigation: Ahmed M. Fahmy, Marwa Khabir.

Méthodologie: Marwa Khabir.

Encadrement: Matthieu Blanchet, Patrick Labonté.

Écriture de version originale: Ahmed M. Fahmy.

Écriture et corrections: Patrick Labonté





OPEN ACCESS

Citation: Fahmy AM, Khabir M, Blanchet M, Labonté P (2018) LC3B is not recruited along with the autophagy elongation complex (ATG5-12/ 16L1) at HCV replication site and is dispensable for viral replication. PLoS ONE 13(10): e0205189. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205189

Editor: Philippe A. Gallay, Scripps Research Institute, UNITED STATES

Received: June 8, 2018

Accepted: September 20, 2018

Published: October 4, 2018

Copyright: © 2018 Fahmy et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported by AMF was supported by a fellowship from NCRTP-HepC. PL was funded by the Natural Science and Engineering Research Council of Canada. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

RESEARCH ARTICLE

LC3B is not recruited along with the autophagy elongation complex (ATG5-12/16L1) at HCV replication site and is dispensable for viral replication

Ahmed M. Fahmy^{1,2}, Marwa Khabir¹, Matthieu Blanchet¹, Patrick Labonté¹*

1 INRS-Institut Armand-Frappier, Institut National de la Recherche Scientifique, Laval, Canada, 2 Molecular Medicine Research Group, Department of Reproductive Medicine, Division of Medical Research, National Research Centre (NRC), Dokki, Egypt

* patrick.labonte@iaf.inrs.ca

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) infection is known to induce autophagosome accumulation as observed by the typical punctate cytoplasmic distribution of LC3B-II in infected cells. Previously, we showed that viral RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) interacts with ATG5, a major component of the autophagy elongation complex that is involved in the formation of double-membrane vesicles (DMV), and demonstrated that the autophagy elongation complex (ATG5-12/16L1) but not LC3B is required for proper membranous web formation. In this study, the colocalization and in situ interaction of all HCV replicase components with the constituent of the autophagy elongation complex and LC3B were analyzed. The results clearly show the recruitment of the elongation complex to the site of viral replication. Using in situ proximity ligation assay, we show that ATG5, but not ATG16L1, interacts with several HCV replicase components suggesting that the recruitment is directed via the ATG5-12 conjugate. Interestingly, no E3-like conjugation activity of ATG5-12/16L1 can be detected at the at HCV replication site since LC3B-II is not found along with the elongation complex at the site of viral replication. In agreement with this result, no sign of in situ interaction of LC3B with the replicase components is observed. Finally, using dominant negative forms of ATG proteins, we demonstrate that ATG5-12 conjugate, but not LC3-II formation, is critical for viral replication. Altogether, these findings suggest that although HCV needs the elongation complex for its replication, it has developed a mechanism to avoid canonical LC3-II accumulation at viral replication site.

Introduction

Hepatitis C virus (HCV) infection leads to a wide spectrum of diseases ranging from asymptomatic to end-stage liver diseases including cirrhosis and hepatocellular carcinoma [1]. HCV is an enveloped, positive-strand RNA virus that belongs to the *Flaviviridae* family. The HCV genome is approximately 9.6 kb in length and consists of a single ORF flanked by two noncoding regions (NCRs). The translated polyprotein is processed by cellular and viral proteases into the structural proteins (core, E1, and E2) and the nonstructural proteins (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, and NS5B)[2]. HCV replication is marked by the formation of a membrane-associated replication complex with a unique membrane alteration referred to as the membranous web [3]. The majority of the membranous structures found within the HCV replication site are composed of double membrane vesicles (DMVs) suggesting that autophagy is involved in the establishment of the HCV replication scaffold [4–6]. DMVs are now strongly suspected of being the primary site of HCV replicase localization where active viral RNA replication occurs [4, 7, 8].

Autophagy is an intracellular catabolic process essential to maintain cell homeostasis which is particularly noticeable under nutrient-deprivation conditions such as starvation [9]. In addition, autophagy provides a cell-autonomous defense system against microbial infections and intracellular pathogens via the autophagosome/lysosome pathway [10, 11]. Autophagy is initiated by the formation of the isolation membrane, the phagophore, which extends to form a closed DMV known as the autophagosome. This structure then fuses with a lysosome to form an autolysosome. The fusion allows the degradation of the autophagosomal cargo by lysosomal enzymes.

Although autophagy has antiviral capability, several viruses and especially positive-strand RNA viruses can use the autophagy machinery for their own benefit [12-16]. Among them, HCV is known to induce accumulation of LC3B-II punctate structures [17, 18]. Furthermore, it was shown that at least a part of the autophagy process is absolutely required for the HCV life cycle in vitro [19, 20]. It has been proposed that HCV may induce autophagosome formation through the unfolded protein response (UPR)[21, 22]. However, others have suggested that autophagy is triggered independently of the UPR in HCV-infected cells [23]. NS4B expression has been shown to be sufficient to induce the accumulation of autophagosomes as seen by the redistribution of diffused LC3 (LC3B-I) to punctate structures (LC3B-II) in NS4Btransfected cells [24]. It has also been demonstrated that induction of autophagy by HCV is important for the suppression of the antiviral interferon response [22, 25]. In addition to this indirect action of autophagy that favors the establishment and the maintenance of HCV, it has been suggested that autophagic proteins promote HCV replication by either facilitating protein translation [18] or virus maturation [20]. It was also shown that upon HCV infection, NS5A transcriptionally upregulates Beclin1, enhances phospho-mTOR expression, and thus, activates mTOR signaling pathway [26]. On the other hand, a more recent study proposed that HCV-induced autophagy occurs via inhibition of AKT-TSC-mTOR via ER stress [27]. In a previous study, we have shown that HCV RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), the NS5B, colocalizes and interacts with ATG5, a component of the autophagy elongation complex and a key factor for the formation of autophagosomes [28]. We also showed that the autophagy elongation complex (ATG5-12/16L1) can be co-purified with the HCV membranous web and that its expression is essential for proper membranous web formation [29]. Therefore, we proposed that the ATG5-12/16L1 complex provide assistance in the formation of membranous structures used by the virus for its replication. The ATG5-12 is an E3-like conjugation enzymes required for LC3-II formation and incorporation on DMVs [30], which is essential for canonical autophagosome maturation. Therefore, it would be expected that LC3-II be localized at the HCV replication site along with the elongation complex. Importantly, recent studies demonstrate that incorporation of LC3-II within the replication complex of positives-sense RNA viruses triggers robust IFN-inducible antiviral responses that disrupt the viral replication shelter [31, 32]. In this study, we confirm that although the autophagy elongation complex is recruited at HCV replication site where it interacts with HCV replicase components as a proviral factor, LC3B-II does not interact in situ with HCV replicase and is not found at the HCV

replication site suggesting that HCV has evolved strategies to avoid LC3 integration within its replication complex.

Materials and methods

Cell culture and reagents

Huh7 cells were obtained from Dr Ralf Bartenschlager and were cultured in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco), supplemented with 10% v/v fetal bovine serum (FBS) (Multicell), 100 U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine (Gibco) at 37°C, 5% CO2, in a humidified incubator.

Plasmids and antibodies

hATG5 and hATG16L1 sequences were cloned into peGFP-C1 plasmid (Clontech) to form pGFP-ATG5 and pGFP-ATG16L1, respectively. The peGFP-LC3 construct was kindly provided by Dr. Tamotsu Yoshimori (Japan) [33]. The pmStrawberry-ATG4BC74A (ATG4B-DN), pcDNA3-mRuby2, and pCI-neo-hApg5-K130R-HA (ATG5-DN) constructs were purchased from Addgene (Cambridge, USA). The Flag-tagged ATG12 (pATG12) and its dominant-negative derivative pATG12ΔG140 (ATG12-DN) constructs were kindly provided by Dr. Adi Kimchi (Israel) [34]. Rabbit polyclonal anti-LC3, rabbit polyclonal anti-ATG5 (used for western blot), mouse monoclonal anti-Flag, and mouse monoclonal anti-β-actin antibodies were purchased from Sigma Aldrich (USA). Mouse monoclonal anti-ATG5 (used for immunofluorescence) and anti-P62 antibodies were purchased from Abnova (Taiwan). Rabbit polyclonal anti-ATG12 was purchased from Cell Signaling (USA). Mouse monoclonal anti-LC3 and rabbit polyclonal anti-ATG16L1 antibody were purchased from MBL (USA). Mouse monoclonal anti-dsRNA was purchased from English & Scientific Consulting (Hungary). Mouse monoclonal anti-HA was purchased from Roche (USA). Mouse monoclonal anti-Core was purchased from Virostat (USA). Mouse monoclonal anti-NS3 and anti-NS5A antibodies were purchased from BioFront (USA). Rabbit polyclonal anti-NS3 and NS5A were obtained from Dr. Olivier Nicolas. Rabbit polyclonal anti-NS4B and anti-NS5B antibodies were kindly provided by Drs. Kouacou Konan (USA) and Takaji Wakita (Japan), respectively. Mouse monoclonal anti- β-actin was purchased from Sigma Aldrich (USA).

Preparation of viral stock and infections

The cell culture-derived HCV (HCVcc) JFH1 virus was generated in Huh7 cells by transfection of *in vitro*-transcribed full-length JFH1 RNA (MEGAscript, Ambion) and viral stocks were produced by infection of Huh7 cells at a multiplicity of infection (MOI) of 0.01, as described previously [35]. To reach 90% infected cells, huh7 cells were infected at MOI of 0.01 and passaged for 7 days then analyzed by immunofluorescence using anti-NS5A antibody.

Western blot analysis

Cells were lysed in 300 µl of lysis buffer [25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP40, Complete protease inhibitor (Roche)]. Lysates were normalized for total protein content using the BCA protein assay kit (Pierce). Proteins were then resolved by SDS-PAGE, transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Bio-Rad), blocked for 30 min at room temperature (RT) with PBS-5% milk, and then incubated overnight at 4°C with primary antibody in PBS-5% milk. After washing with 0.1% Tween 20 in PBS (PBST), membranes were incubated 1 h at RT with a goat-anti-rabbit or goat-anti-mouse IgG conjugated to horseradish

peroxidase in PBS-5% milk. Protein bands were visualized with either the Super Signal West-Pico or -Femto chemiluminescence substrates (Pierce).

Indirect immunofluorescence

Huh7 cells infected at greater than 90% were transfected with different plasmids as indicated in figure legends. At 24 h post-transfection, cells were trypsinized and grown on glass coverslips for another 24 h. The coverslips were then fixed with 4% formaldehyde in PBS for 10 min, washed in PBS and incubated in blocking buffer (PBS, 3% bovine serum albumin, 10% FBS, 0.1% Triton X-100) for 30 min at RT. For the detection of GFP-LC3, cells were permeabilized with 0.05% saponin to remove dispersed LC3 (LC3-I) [27]. After washing with PBS, the coverslips were incubated with primary antibodies in blocking buffer for 1 h at RT. Coverslips were then washed in PBS and incubated with either Alexa fluor-(488 or 568) goat anti-mouse IgG or Alexa fluor-(488 or 568) goat anti-rabbit IgG (Invitrogen) for 1h at RT. After washing, coverslips were mounted on glass slides with Prolong Antifade (Invitrogen) and examined with either a laser scanning confocal BioRad Radiance 2000 or a Zeiss LSM 780. The Manders'coefficient of colocalization was obtained using ImageJ software (NIH) in randomly selected regions that were positive for the targeted proteins from different cells. Manders'coefficient values over 0.4 were considered as strong colocalization.

In situ proximity ligation assay (PLA)

Huh7 cells infected at greater than 90% were grown on glass coverslips for 24 h prior to the fixation with 4% formaldehyde in PBS for 10 min. They were then washed in PBS and incubated in blocking buffer (PBS, 3% bovine serum albumin, 10% FBS, 0.1% Triton X-100) for 30 min at RT. Coverslips were incubated with primary antibodies for 1 h at RT then washed three times with 1x wash buffer A (Duolink (and incubated with PLA probes (anti-rabbit plus and anti-mouse minus) diluted with the provided buffer in a humidity chamber for 1 h at 37°C. Coverslips were then washed three times with 1x wash buffer A and incubated with the ligation-ligase reaction solution in a humidity chamber for 30 min at 37°C. Amplification and mounting steps were performed according to manufacturer's instructions. Mounted coverslips were examined with a laser scanning confocal microscope (Zeiss LSM 780). Each detected signal represents an interaction event. The analysis of PLA signal frequency was done using Duolink Image Tool.

Quantification of HCV RNA by qRT-PCR

RNA was reverse transcribed with M-MLV (Invitrogen). Generated cDNA was used for qPCR (Taqman) as described earlier [36]. Results were analyzed using the comparative Δ Ct method.

Flow cytometry

Huh7 cells infected at greater than 90% were transfected with either mock (pcDNA3-mRuby2) or ATG4B-DN. At day 2 cells were trypsinized and washed twice with PBS. Dead cells were labeled using FVD780 (eBioscience). Cells were fixed with 4% formaldehyde for 10 min at RT, incubated with blocking buffer (PBS, 2% BSA, 0.2% Saponin) for 20 min at 4°C and incubated with primary antibodies diluted in blocking buffer for 30 min at 4°C. After washing with PBS, cells were incubated with Alexa fluor-488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen) for 30 min at 4°C. Cells were analyzed using BD LSRFortessa cell analyzer (BD Biosciences) and Cyflogic software (CyFlo Ltd).

Statistical analyses

Results shown represents the means of at least three independent experiments. Either Student's t-test or ANOVA analysis was performed to identify statistically significant differences. P values below 0.05 were considered statistically significant.

Results

Formation of the ATG5-12 conjugate and the autophagy elongation complex ATG5-12/16L1 in Huh7 cells

We have shown in a previous study that HCV polymerase interacts with ATG5, a protein that participates in early events during induction of autophagy [28]. Since ATG5 is normally conjugated to ATG12, we first compared the conjugation status of ATG5 in Huh7 infected and uninfected cells. The results showed that the unconjugated form of ATG5 (32 kDa) was undetectable in both infected and uninfected cells. Indeed, ATG5 was exclusively detected as ATG5-12-conjugated form (55 kDa) (Fig 1A). The absence of detectable unconjugated ATG5





в



Fig 1. Formation of the autophagy elongation complex in Huh7 cells. A. Detection of the ATG5-12 conjugate by Western blot in mock (UI) and JFH1 infected Huh7 cells at more than 90% using an anti-ATG5 antibody. HCV infection and autophagosome accumulation were detected using anti-NS3 and anti-LC3 antibodies, respectively. β-actin represents loading control. B. *In situ* ATG5-12/16L1 complex formation was analyzed using PLA in JFH1-infected at more than 90% or uninfected cells. Cells were labeled for ATG5-12 and ATG16L1 using anti-ATG5 and anti-ATG16L1 respectively. CTL represents negative control lacking anti-ATG5 antibody. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar, 20µm. C. The frequency of PLA signals were significantly higher in both JFH1-infected and uninfected cells compared to control cells (CTL) (based on the count in 40 cells for each condition) (P<0.0001, 1way ANOVA).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205189.g001

PLOS ONE | https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205189 October 4, 2018



Fig 2. Components of the HCV replicase colocalize with ATG5-12 conjugate in Huh7 cells. A. JFH1-infected Huh7 cells at more than 90% were probed for endogenous ATG5-12 conjugate using a mouse anti-ATG5 antibody and HCV nonstructural proteins (NS3, NS4B, NS5A, and NS5B) using rabbit specific antibodies as described in the materials and methods section. The nuclei were stained with DRAQ5 (blue). Confocal microscopy images displaying subcellular localization of endogenous ATG5-12 conjugate and
viral NS3, NS4A, NS5A, and NS5B in merged image panels are shown. Marked colocalization between endogenous ATG5-12 conjugate and components of the viral replicase (NS3, NS5A, and NS5B) or the membranous web (NS4B) was observed. Scale bar, 10 μ m. B. The average of colocalized pixels of ATG5-12 and HCV nonstructural proteins (n = 5 cells, 10 arbitrary positions) was determined. The values of overlapping fluorescence signal with HCV nonstructural proteins were calculated using Manders' colocalization coefficient. C. Localization of ATG5-12 in uninfected cells. Uninfected Huh7 cells were immunostained for ATG5-12 using a mouse anti-ATG5 antibody. Scale bar, 10 μ m.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205189.g002

suggests that most of the ATG5 is readily conjugated to ATG12 in Huh7 cells, as previously reported for other cell types [37]. Additionally, HCV infection did not hamper this conjugation. Moreover, results show that infection induces the accumulation of LC3-II, a hallmark of induced autophagy (Fig 1A).

Once ATG5 is conjugated to ATG12, it can form a multimeric complex by association with ATG16L1 [38]. To assess whether this interaction occurs during infection, we investigated the presence of ATG5-12/16L1 complex by *in situ* proximity ligation assay (PLA). This novel technique has been used in several studies to detect specific *in situ* interactions [39–42]. Clearly, endogenous ATG5-12/16L1 complexes were detected in both infected and uninfected cells (Fig 1B and 1C). It is noteworthy that the count of interaction signals was slightly lower in infected cells. Although the significance of this reduction is not ascertained at the moment, our results suggest that HCV infection still allows the formation of the high molecular weight complex ATG5-12/16L1 that occurs spontaneously *in vitro* [43, 44].

The ATG5-12 conjugate colocalizes and interacts with viral nonstructural proteins

We then assessed the colocalization between the endogenous ATG5-12 conjugate and the components of the viral replicase in JFH1-infected Huh7 cells using an anti-ATG5 antibody. The results presented in Fig 2A and 2B show distinct membrane-like structures that are positive for the ATG5-12 conjugate as well as for HCV NS3, NS4B, NS5A, and NS5B. The distribution of ATG5-12 in uninfected cells is shown in Fig 2C. We also confirmed the colocalization of the ATG5-12 conjugate with the nonstructural viral proteins using an ATG12-Flag protein (Fig 3). These results support our previous study showing a crucial role of ATG5-12 in membranous web formation. Indeed, the high level of colocalization obtained suggests a putative direct interaction. Therefore PLA was performed to evaluate the in situ interaction between the ATG5-12 conjugate and components of the viral replicase (Fig 4). As a positive control, we started by analyzing the known ATG5/NS5B interaction in infected cells. The result showed that on average, 380 ATG5-12/NS5B interaction signals were detected per infected cells (Fig 4E). We then sought to screen for all other possible interactions of ATG5-12 conjugate and HCV non-structural proteins for which colocalizations were observed. As we showed earlier, NS3, NS4B and NS5A colocalize with ATG5-12 (Figs 2 and 3). Indeed, PLA experiments revealed that ATG5 interacts with these viral proteins in situ (Fig 4B-4D). In contrast, no interaction was observed between endogenous ATG5 and the viral core protein (Fig 4A). Since no colocalization was detectable in infected cells between these two proteins (data not shown), this PLA experiment was used as a specificity control of the assay. The PLA results, along with the colocalization findings from Figs 2 and 3, strengthen the hypothesis of the involvement of ATG5-12 conjugate in HCV replication.

The autophagy elongation complex (ATG5-12/ATG16L1) is found at the HCV replication site

In order to complete its normal functions, the ATG5-12 conjugate associates with ATG16L1 to form the autophagy elongation complex that allows the expansion of the autophagosomal



Fig 3. HCV nonstructural proteins colocalize with ATG12 protein in Huh7 cells. A. Huh7 cells were infected with HCVcc and then transfected with recombinant Flag-tagged ATG12. Confocal microscopy images displaying subcellular localization of ATG12 (green) and components of the viral replicase (NS3, NS5A and NS5B) (red) in merged images are shown. Scale bar, 10µm. B. The average colocalization of ATG12 and HCV nonstructural proteins (n = 5 cells, 10 arbitrary positions) was calculated using Manders' colocalization coefficient. C. Localization of flag-tagged ATG12 in unifected cells. Uninfected Huh7 cells were immunostained for ATG12 using a mouse anti-flag antibody. Scale bar, 10µm.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205189.g003

membrane [38, 45]. Therefore, we sought to determine if the elongation complex, and not only ATG5-12 conjugate, is recruited to the site of viral replication. The subcellular



Fig 4. Assessment of ATG5-12 interactions with viral proteins in infected cells as observed by proximity-ligation assay (PLA). JFH1-infected at more than 90% or uninfected cells were fixed and processed for detection of ATG5-12-Core, ATG5-12-NS3, ATG5-12-NS4B, ATG5-12-NS5A or ATG5-12-NS5B complexes by PLA using appropriate antibodies. Nuclei were stained with DAPI (blue). Each PLA signal (red dot) indicates one interaction and were calculated as described in materials and methods section. In A, no significant difference in the frequency of PLA signals between JFH1-infected (n = 50) cells compared to uninfected controls (n = 50) indicating undetectable interaction between ATG5-12 conjugate and core. However, the incidence of PLA signals in B-E was significantly higher in JFH1-infected (n \geq 23) cells compared to uninfected negative controls (N = 50) (P<0.0001, Student's t-test) indicating complexes formation between ATG5-12 and NS3, NS4B, NS5A and NS5B. Scale bar, 20µm.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205189.g004

localization of either the endogenous ATG16L1 or a GFP-tagged human ATG16L1 protein was monitored in infected Huh7 cells. The GFP-ATG16L1 was used only when detection of endogenous ATG16L1 was not readily possible due to conflict in antibody species. Results show marked localization between ATG16L1 and several HCV nonstructural proteins that constitute the viral replicase as well as the NS4B protein (Fig 5). Despite the obvious colocalization of ATG16L1 with NS3 and NS5A, we were unable to detect *in situ* interaction of endogenous ATG16L1 and these proteins in infected cells using PLA (Fig 6A and 6B). These results suggest that the interaction of ATG5-12/16L1 with viral NS3 and NS5A occurs through ATG5-12 rather than ATG16L1.

Previously, we demonstrated that the elongation complex is found within the membranous web and is essential for its formation [29]. To support the hypothesis of an *in situ* interaction observed between ATG5-12/16L1 and HCV replicase components taking place, at least in part, within the replication complex, we analyzed the colocalization of the elongation complex with dsRNA (Fig 7). In infected cells, most of the dsRNA is expected to represent the HCV replication intermediate and thus, the replication site. As a positive control, the dsRNA-NS3 colocalization was assessed. HCV dsRNA markedly colocalized with the viral NS3 protein which harbors helicase activity and is known to be a constituent of the replicase (Fig 7A and 7B). The specificity of the dsRNA colocalizes with both ATG5-12 conjugate and ATG16L1 (Fig 7A and 7B), thus confirming the presence of ATG5-12 and ATG16L1 at the HCV replication site.

LC3B-II is not recruited at the replication site and is not essential for HCV replication

As mentioned earlier, the presence of the E3-like conjugation enzyme ATG5-12/16L1 at HCV replication site should normally result in the addition of phosphatidylethanolamine (PE) to LC3-I allowing its membrane incorporation, as LC3-II, at this site. In a recent study, using knockdown experiments, we showed that ATG5-12, but not LC3, is important for proper membranous web formation [29]. With that in mind, we wondered if LC3-II is actually incorporated at HCV replication site. Because all members of the HCV replicase are known to be membrane associated, incorporation of LC3-II at the replication site can be evaluated by its colocalization with HCV proteins that reside within the replication site. Interestingly, despite strong colocalization of the elongation complex with HCV non-structural proteins (Figs 2, 3 and 5), no colocalization signals were observed between GFP-LC3II and HCV proteins (Fig 8). In agreement with this result, we were unable to detect any in situ interaction between endogenous LC3 and HCV proteins (Fig 9). As control, the known association of LC3 with its receptor P62 was compared in HCV infected and uninfected cells. As expected, the interaction was detected in either cases but was clearly more abundant in HCV infected cells (Fig 9F). This result is in favor of a model where HCV-induced autophagosome accumulation with a concomitant blockage of the autophagic flux as previously suggested [21, 46]. Altogether, these results demonstrate that





NS3 NS4B NS5A NS5B

Fig 5. HCV nonstructural proteins colocalize with ATG16L1 in Huh7 cells. A. Huh7 cells infected with JFH1 at more than 90% and then transfected with pGFP-ATG16L1 or immunostained for endogenous ATG16L1 using a rabbit specific antibody. Confocal microscopy images displaying subcellular localization of GFP-ATG16L1 or endogenous ATG16L1 and viral NS3, NS4B, NS5A, and NS5B are shown. Scale bar, 10µm. B. The values of overlapping fluorescence signal of ATG16L1 and GFP-ATG16L1 with HCV nonstructural proteins were calculated using Manders' colocalization coefficient (n = 5 cells, 10 arbitrary positions). C. Uninfected Huh7 cells transfected with gGFP-ATG16L1 (left) or immunostained for endogenous ATG16L1 in the nucleus in blue (Dapi). Scale bar, 10µm.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205189.g005

LC3-II cannot be detected at the HCV replication site. We cannot exclude that LC3-II is transiently incorporated in membrane at the replication site and rapidly removed and/or degraded. However, clearly, LC3-II does not accumulate at the HCV replication site which implies that HCV has evolved to block canonical progression of autophagy at this site.

The involvement of LC3 in HCV replication-cycle has been addressed previously. LC3 was found to favor HCV translation early in infection with no remaining proviral effect in chronically infected cells [19, 29]. Here, we overexpressed an ATG4B dominant negative protein to evaluate the putative implication of LC3-II in HCV replication-cycle. Indeed, ATG4B is a cysteine protease that prepares LC3-I for conjugation through a proteolytic process essential for LC3-II formation [47]. Overexpression of the ATG4B-DN has been shown to inhibit LC3 lipidation and its downstream-dependent events [48]. Indeed, upon overexpression of ATG4B-DN in Huh7 cells, we observed a 0marked decrease in LC3-II formation and accumulation of P62 which indicates an inhibition of autophagy late events, such as autophagosome maturation and cargo degradation (Fig 10A). In line with our previous report [29], overexpression of ATG4B-DN had no obvious inhibitory effect on HCV polyprotein expression or HCV RNA replication in cells already infected, as indicated by the levels of NS3 and core protein (Fig 10B and 10C). Since these results were obtained upon transient expression using transfection with efficiency around 40–50%, we performed a FACS analysis taking the advantage of



frequency of PLA signals between JFH1-infected (n = 50) cells compared to uninfected controls (n = 50). Scale bar, 20µm. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205189.g006

PLOS ONE | https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205189 October 4, 2018

Α





Fig 7. The autophagy elongation complex colocalizes with HCV replicative intermediate dsRNA. A. JFH1-infected Huh7 cells at more than 90% were immunostained for dsRNA and NS3 or ATG16L1. Alternatively, infected cells were transfected with pGFP-ATG5 and analyzed by confocal microscopy for dsRNA and GFP-ATG5. Scale bar, 10µm. B. The average of percent colocalization of NS3, GFP-ATG5 or ATG16L1 with dsRNA was determined. The values of overlapping fluorescence signals with dsRNA proteins were calculated using Manders' colocalization coefficient (n = 5 cells, 10 arbitrary positions). C. Uninfected Huh7 cells immunostained for dsRNA. Negative staining shows specificity of dsRNA utilized in this experiment. Scale bar, 10µm.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205189.g007

the fluorescence property of the mStrawberry tag of ATG4B-DN (Fig 10D) to specifically gate on cells expressing ATG4B-DNin order to assess the level of NS3 expression in this targeted population. The result confirmed that expression of the dominant-negative form of ATG4B

Α

-LC3 Merge GFP Merge GFP-LC3 GFP-LC3 Merge -Merge GFP-LC3 1 GFP-LC3 Merge

PLOS ONE | https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205189 October 4, 2018

В

Fig 8. LC3 does not colocalize with HCV proteins. A. Huh7 cells were infected with JFH1 and then transfected with GFP-LC3. Confocal microscopy images displaying subcellular localization of GFP-LC3 and HCV core, NS3, NS4B, NS5A and NS5B are presented. Scale bar, 10µm. B. The values of overlapping fluorescence signal of GFP-LC3 with HCV nonstructural proteins were calculated using Manders' colocalization coefficient (n = 5 cells, 10 arbitrary positions).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205189.g008

has no adverse effect on viral proteins expression (Fig 10E). Together, these results suggest that LC3 lipidation is not mandatory for viral replication in established infection.

ATG12 conjugation to ATG5 is required for HCV replication in Huh7 cells

Finally, we analysed the importance of conjugation events that precedes LC3II formation by investigating the effect of decoupling the formation of the ATG5-12 conjugate on HCV replication. To achieve this, we overexpressed the dominant-negative forms of ATG5 (ATG5-DN) and ATG12 (ATG12-DN) that have been specifically engineered to impede ATG12 conjugation to ATG5 as previously reported [34]. As expected, the overexpression of the dominant negative forms of these proteins blocked the conjugation of ATG12 to ATG5 as well as its subsequent events, the formation of ATG5-12/16L1 complex, and LC3 lipidation (Fig 10F). Interestingly, when compared to a wild-type ATG12, these conjugation-defective mutants display an adverse effect on HCV lifecycle, as indicated by a decrease in the NS3 and core protein (Fig 10B). Together, these results suggest that the ATG5-12 conjugated form, rather than the individual ATG5 and ATG12 proteins, act as HCV proviral factor.

Discussion

In a previous study, we showed that HCV RdRp colocalizes and interacts with ATG5, a component of the elongation complex [28]. Here we show that the ATG5-12 conjugate clearly colocalizes on structures that harbor several HCV nonstructural proteins such as NS3, NS4B, NS5A, and NS5B (Figs 2 and 3). We then looked for *in situ* interaction between members of the viral replicase and that of the elongation complex. The results indicate that ATG5 is in close proximity to several HCV nonstructural proteins in infected cells (Fig 4). Since ATG5-12 forms a high molecular weight multimeric complex with ATG16L1 that is absolutely required for autophagosome formation [45], we then analyzed the recruitment of ATG16L1 at the site of HCV replication (Fig 5). Several membranous structures were positive for both ATG16L1 and nonstructural viral proteins. Furthermore, by labeling dsRNA, we were able to show that the replicating HCV RNA colocalizes with the autophagy elongation complex (Fig 7). Together, these results confirm that ATG16L1 is recruited at the site of HCV replication where the elongation complex is formed.

The ATG5-12/16 complex is known to dictate the site of LC3 lipidation [49] due to the E3-like enzyme activity of the ATG5-12 conjugate that is required for the conjugation process of LC3-II which is an essential step in autophagosome formation [30, 50]. Therefore, LC3-II was expected to colocalize with NS4B, NS3, or NS5B. Interestingly we, as well as several other groups [17, 18, 20], were unable to observe colocalization of LC3 with HCV proteins (Fig 8). To further confirm the lack of interconnection between LC3 and HCV replicase component, a PLA experiment that can reveal difficult-to-detect *in situ* interaction was performed (Fig 9). The total absence of interaction or even colocalization was very intriguing since HCV has been shown to trigger the appearance of LC3-II throughout the infected cell [17].

As LC3 was not recruited at the site where the replication complex is localized, we decided to analyze the contribution of LC3-II formation in HCV replication. For this purpose, we used a dominant-negative form of ATG4B (ATG4B-DN) that blocks LC3-II formation. The results demonstrate that although LC3-II formation was indeed severely affected by the ATG4B-DN



Fig 9. Assessment of LC3 interactions with viral proteins in infected cells as observed by proximity-ligation assay (PLA). JFH1-infected at more than 90% or uninfected cells were fixed and processed for detection of LC3-Core, LC3-NS3, LC3-NS4B, LC3-NS5B, or LC3-PS2 (positive control) complexes by PLA using appropriate antibodies. Nuclei were stained with DAPI (blue Interaction signals were counted as described in materials and methods. In A-E, no significant difference in the frequency of PLA signals between JFH1-infected (n = 50) cells compared to uninfected controls (n = 50) indicating undetectable interaction between LC3 and the viral proteins. F. As control, the *in situ* interaction between LC3 and its natural ligand P62 was measured in both infected and uninfected cells. Interestingly, the incidence of PLA signals in F was significantly higher in JFH1-infected cells compared to uninfected negative controls (N = 50) (P < 0.0001, Student's t-test). Scale bar, 20µm.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205189.g009

expression, no inhibitory effect on HCV replication was observed. The results presented in Fig 10 also confirm that the ATG5-12 conjugate is truly important for HCV replication. Indeed, transfection of Huh7 with either ATG5-DN or ATG12-DN, led to a significant decrease in HCV replication. This result not only demonstrates the importance of both proteins but also shows that their conjugation is required for HCV replication.

How exactly the ATG5-12/16L1 complex modulates HCV replication is still unclear. We postulated that HCV infection might trigger *de novo* synthesis of DMV through activation of autophagy since the autophagy elongation complex is essential for proper membranous web formation [29]. Recently, it was shown that DFCP-1, a protein that generates omegasomes, is required for HCV RNA replication. Viral NS5A transiently colocalizes with DFCP-1 on ER protrusions suggesting that omegasomes may provide vesicles on which HCV can replicate [51]. Since the autophagy elongation complex could be recruited at the nascent omegasome for its elongation, it might participate in the creation of the HCV-induced membranous web. Alternatively, the autophagy elongation complex could facilitate membranous web formation through its known capability of enhancing membrane tethering and vesicles aggregation *in vitro* [52].

Previous reports along with the results presented here strongly suggest that the proviral effect of the ATG5-12/16L1 complex is through a noncanonical autophagy process. Indeed, LC3 is clearly not present at the HCV replication site (Fig 8) and is not involved in membranous web formation [29]. Recently a study on another hepatotropic human virus, HBV, demonstrated that the ATG5-12 conjugate but not LC3 acts as a proviral factor [53], suggesting that for some viruses the autophagy machinery rather than the autophagy process have been evolutionary hijacked for their benefits. One possible explanation is that several viruses including HCV have generated strategies to block the antiviral degradative capability of autophagy [21, 54–57]. Indeed, viruses have been shown to block the autophagic flux either by inhibiting autophagosome-lysosome fusion or lysosome acidification. Here, we suggest that by impeding recruitment of LC3 at HCV replication site, degradation of the HCV replication complex by canonical autophagy is eluded. More importantly, a recent study on norovirus, a positivestranded RNA virus, demonstrated that viral replication complexes can be destroyed via an evolutionary conserved LC3-guided IFN-inducible GTPases antiviral response [32]. Therefore, by preventing LC3 from reaching its replication complexes, HCV may evade this antiviral response as well.

In summary, recruitment of the autophagy elongation complex, which is normally involved in DMV formation, to the HCV replication site, promotes viral replication. Interestingly, the recruitment of the elongation complex is not accompanied by LC3 lipidation at this site. Therefore, HCV infection cycle is more dependent on ATG5-12 conjugation than on LC3 lipidation. Altogether, we believe that HCV has evolved to hijack the autophagy machinery, namely the elongation complex, to promote it replication and to block LC3 recruitment to avoid both antiviral canonical autophagy and LC3-guided INF-inducible GTPases.



Fig 10. ATG5-12 conjugation but not LC3-II formation is important for the HCV lifecycle. A. Huh7 cells were either transfected with an empty plasmid (mock) or a plasmid encoding an enzymatically inactive dominant negative form of ATG4B (ATG4B-DN). Cell lysates were analyzed by Western blot at 72 h post-transfection for LC3-I to LC3-II conversion and P62 accumulation. B. JFH1-infected Huh7 cells (>90% infected) were transfected with plasmids encoding ATG12 or the dominant negative forms of ATG5, ATG12, or ATG4B. Cell lysates of transfected cells were analyzed 72 h post-transfection for HCV core and helicase expression using anti-NS3 by western blot. β actin was used for normalization. C. Infected Huh7 cells (>90% infected) were transfected with a plasmid encoding ATG12, ATG4B-DN or ATG12DN. Cell lysates of transfected cells were analyzed 72 h post-transfection for HCV RNA by RT-qPCR. D. Huh7 cells were transfected with pmStrawberry-ATG4BC74A (ATG4B-DN). At 48hr post transfection, immunofluorescence images were taken for ATG4BDN (red) and nucleus (blue). Scale bar, 10µm. E. Infected Huh7 cells (>90% infected) were either mock-transfected (empty plasmid) or transfected with pmStrawberry-ATG4BC74A (ATG4B-DN). Transfected cells were stained for NS3 as described in materials and methods then analyzed by flow cytometry at 72 h post-transfection for NS3 expression gating on red-fluorescent cells (pmStrawberry-ATG4B-DN positive cells). F. Huh7 cells were either transfected with an empty plasmid (mock) or a plasmid encoding a conjugationdefective dominant negative form of ATG5 (ATG5-DN) or ATG12 (ATG12-DN) tagged with HA or Flag respectively. Cell lysates were analyzed by Western blot at 72 h post-transfection for elongation complex formation (ATG5-12/16L1), ATG5-12 conjugation, and LC3-I to LC3-II conversion using anti-ATG5 and anti-LC3, respectively. The expression of ATG5-DN and ATG12-DN was verified using anti-HA and anti-Flag, respectively. β-actin was used as loading control.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205189.g010

Acknowledgments

We thank Dr. Takaji Wakita for providing the HCV JFH-1 and the NS5B antibody. We are also grateful to Dr. Kouacou Konan for providing the NS4B antibody and Dr. Adi Kimchi for providing the ATG12 Δ G140 plasmid. The GFP-LC3 and pmStrawberry-ATG4BC74A constructs were kindly supplied by Dr. Tamotsu Yoshimori. The pCI-neo-hApg5-K130R-HA and pcDNA3-mRuby2 constructs were kindly provided by Drs. Noboru Mizushima and Micheal Lin respectively. We also thank Quoc Tuan Le and Jessy Tremblay for technical assistance.

Author Contributions

Conceptualization: Ahmed M. Fahmy, Patrick Labonté.

Investigation: Ahmed M. Fahmy, Marwa Khabir.

Methodology: Marwa Khabir.

Project administration: Patrick Labonté.

Supervision: Matthieu Blanchet, Patrick Labonté.

Writing – original draft: Ahmed M. Fahmy.

Writing - review & editing: Patrick Labonté.

References

- Webster DP, Klenerman P, Collier J, Jeffery KJ. Development of novel treatments for hepatitis C. Lancet Infect Dis. 2009; 9(2):108–17. Epub 2009/01/31. doi: S1473-3099(09)70020-9 [pii] https://doi.org/ 10.1016/S1473-3099(09)70020-9 PMID: 19179226.
- Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. Nat Rev Microbiol. 2007; 5(6):453–63. https://doi.org/10.1038/nrmicro1645 PMID: 17487147.
- Wang QM, Hockman MA, Staschke K, Johnson RB, Case KA, Lu J, et al. Oligomerization and cooperative RNA synthesis activity of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. J Virol. 2002; 76 (8):3865–72. https://doi.org/10.1128/JVI.76.8.3865-3872.2002 PMID: 11907226; PubMed Central PMCID: PMC136118.
- Sir D, Kuo CF, Tian Y, Liu HM, Huang EJ, Jung JU, et al. Replication of hepatitis C virus RNA on autophagosomal membranes. J Biol Chem. 2012; 287(22):18036–43. Epub 2012/04/13. https://doi.org/10. 1074/jbc.M111.320085 PMID: 22496373; PubMed Central PMCID: PMC3365724.
- Combs C, Brunt EM, Solomon H, Bacon BR, Brantly M, Di Bisceglie AM. Rapid development of hepatic alpha1-antitrypsin globules after liver transplantation for chronic hepatitis C. Gastroenterology. 1997; 112(4):1372–5. Epub 1997/04/01. PMID: 9098024.

- Romero-Brey I, Merz A, Chiramel A, Lee JY, Chlanda P, Haselman U, et al. Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. PLoS Pathog. 2012; 8(12):e1003056. Epub 2012/12/14. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003056 PMID: 23236278; PubMed Central PMCID: PMC3516559.
- Wang L, Kim JY, Liu HM, Lai MMC, Ou JJ. HCV-induced autophagosomes are generated via homotypic fusion of phagophores that mediate HCV RNA replication. PLoS Pathog. 2017; 13(9):e1006609. https:// doi.org/10.1371/journal.ppat.1006609 PMID: 28931085; PubMed Central PMCID: PMCPMC5621699.
- Kim JY, Wang L, Lee J, Ou JJ. Hepatitis C Virus Induces the Localization of Lipid Rafts to Autophagosomes for Its RNA Replication. J Virol. 2017;91(20). https://doi.org/10.1128/JVI.00541-17 PMID: 28747506; PubMed Central PMCID: PMCPMC5625520.
- Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. Science. 2000; 290 (5497):1717–21. Epub 2000/12/02. PMID: 11099404; PubMed Central PMCID: PMC2732363.
- Oh JE, Lee HK. Modulation of pathogen recognition by autophagy. Front Immunol. 2012; 3:44. Epub 2012/05/09. https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00044 PMID: 22566926; PubMed Central PMCID: PMC3342359.
- Into T, Inomata M, Takayama E, Takigawa T. Autophagy in regulation of Toll-like receptor signaling. Cell Signal. 2012; 24(6):1150–62. Epub 2012/02/16. <u>https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.020</u> PMID: 22333395.
- Jackson WT, Giddings TH Jr., Taylor MP, Mulinyawe S, Rabinovitch M, Kopito RR, et al. Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. PLoS Biol. 2005; 3(5):e156. Epub 2005/05/12. doi: 03-PLBI-RA-0370R3 [pii] https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030156 PMID: 15884975; PubMed Central PMCID: PMC1084330.
- Li JK, Liang JJ, Liao CL, Lin YL. Autophagy is involved in the early step of Japanese encephalitis virus infection. Microbes Infect. 2012; 14(2):159–68. Epub 2011/09/29. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011. 09.001 PMID: 21946213.
- McLean JE, Wudzinska A, Datan E, Quaglino D, Zakeri Z. Flavivirus NS4A-induced autophagy protects cells against death and enhances virus replication. J Biol Chem. 2011; 286(25):22147–59. Epub 2011/ 04/23. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.192500 PMID: 21511946; PubMed Central PMCID: PMC3121359.
- Heaton NS, Randall G. Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism. Cell Host Microbe. 2010; 8(5):422–32. Epub 2010/11/16. doi: S1931-3128(10)00343-4 [pii] https://doi.org/10.1016/j.chom. 2010.10.006 PMID: 21075353; PubMed Central PMCID: PMC3026642.
- Liu Q, Qin Y, Zhou L, Kou Q, Guo X, Ge X, et al. Autophagy sustains the replication of porcine reproductive and respiratory virus in host cells. Virology. 2012; 429(2):136–47. Epub 2012/05/09. https://doi.org/ 10.1016/j.virol.2012.03.022 PMID: 22564420.
- Ait-Goughoulte M, Kanda T, Meyer K, Ryerse JS, Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus genotype 1a growth and induction of autophagy. J Virol. 2008; 82(5):2241–9. Epub 2007/12/14. doi: JVI.02093-07 [pii] 10.1128/JVI.02093-07. https://doi.org/10.1128/JVI.02093-07 PMID: 18077704; PubMed Central PMCID: PMC2258951.
- Dreux M, Gastaminza P, Wieland SF, Chisari FV. The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009; 106(33):14046–51. Epub 2009/08/12. doi: 0907344106 [pii] https://doi.org/10.1073/pnas.0907344106 PMID: 19666601; PubMed Central PMCID: PMC2729017.
- Dreux M, Chisari FV. Autophagy proteins promote hepatitis C virus replication. Autophagy. 2009; 5 (8):1224–5. Epub 2009/10/22. doi: 10219 [pii]. PMID: 19844160.
- Tanida I, Fukasawa M, Ueno T, Kominami E, Wakita T, Hanada K. Knockdown of autophagy-related gene decreases the production of infectious hepatitis C virus particles. Autophagy. 2009; 5(7):937–45. Epub 2009/07/25. doi: 9243 [pii]. PMID: 19625776.
- Sir D, Chen WL, Choi J, Wakita T, Yen TS, Ou JH. Induction of incomplete autophagic response by hepatitis C virus via the unfolded protein response. Hepatology. 2008; 48(4):1054–61. Epub 2008/08/09. https://doi.org/10.1002/hep.22464 PMID: 18688877; PubMed Central PMCID: PMC2562598.
- Ke PY, Chen SS. Activation of the unfolded protein response and autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity in vitro. J Clin Invest. 2011; 121(1):37–56. Epub 2010/12/ 08. https://doi.org/10.1172/JCl41474 PMID: 21135505; PubMed Central PMCID: PMC3007134.
- Mohl BP, Tedbury PR, Griffin S, Harris M. Hepatitis C virus-induced autophagy is independent of the unfolded protein response. J Virol. 2012; 86(19):10724–32. Epub 2012/07/28. <u>https://doi.org/10.1128/</u> JVI.01667-12 PMID: 22837205.
- Su WC, Chao TC, Huang YL, Weng SC, Jeng KS, Lai MM. Rab5 and class III phosphoinositide 3-kinase Vps34 are involved in hepatitis C virus NS4B-induced autophagy. J Virol. 2011; 85(20):10561–71. Epub

2011/08/13. https://doi.org/10.1128/JVI.00173-11 PMID: 21835792; PubMed Central PMCID: PMC3187495.

- 25. Shrivastava S, Raychoudhuri A, Steele R, Ray R, Ray RB. Knockdown of autophagy enhances the innate immune response in hepatitis C virus-infected hepatocytes. Hepatology. 2010; 53(2):406–14. Epub 2011/01/29. https://doi.org/10.1002/hep.24073 PMID: 21274862.
- Shrivastava S, Bhanja Chowdhury J, Steele R, Ray R, Ray RB. Hepatitis C Virus Upregulates Beclin1 for Induction of Autophagy and Activates mTOR Signaling. J Virol. 2012; 86(16):8705–12. Epub 2012/ 06/08. https://doi.org/10.1128/JVI.00616-12 PMID: 22674982; PubMed Central PMCID: PMC3421755.
- Huang H, Kang R, Wang J, Luo G, Yang W, Zhao Z. Hepatitis C virus inhibits AKT-tuberous sclerosis complex (TSC), the mechanistic target of rapamycin (MTOR) pathway, through endoplasmic reticulum stress to induce autophagy. Autophagy. 2013; 9(2):175–95. https://doi.org/10.4161/auto.22791 PMID: 23169238; PubMed Central PMCID: PMC3552882.
- Guevin C, Manna D, Belanger C, Konan KV, Mak P, Labonte P. Autophagy protein ATG5 interacts transiently with the hepatitis C virus RNA polymerase (NSSB) early during infection. Virology. 2010; 405 (1):1–7. Epub 2010/06/29. doi: S0042-6822(10)00376-4 [pii] PubMed Central PMCID: PMC2925245. https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.05.032 PMID: 20580051
- Fahmy AM, Labonte P. The autophagy elongation complex (ATG5-12/16L1) positively regulates HCV replication and is required for wild-type membranous web formation. Sci Rep. 2017; 7:40351. https:// doi.org/10.1038/srep40351 PMID: 28067309; PubMed Central PMCID: PMCPMC5220323.
- Sakoh-Nakatogawa M, Matoba K, Asai E, Kirisako H, Ishii J, Noda NN, et al. Atg12-Atg5 conjugate enhances E2 activity of Atg3 by rearranging its catalytic site. Nat Struct Mol Biol. 2013; 20(4):433–9. https://doi.org/10.1038/nsmb.2527 PMID: 23503366.
- Biering SB, Choi J, Brown HM, Hwang S. LC3s hire membrane breakers to attack viral shelters. Autophagy. 2017:1–3. https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1371396 PMID: 28949789.
- Biering SB, Choi J, Halstrom RA, Brown HM, Beatty WL, Lee S, et al. Viral Replication Complexes Are Targeted by LC3-Guided Interferon-Inducible GTPases. Cell Host Microbe. 2017; 22(1):74–85 e7. https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.06.005 PMID: 28669671; PubMed Central PMCID: PMCPMC5591033.
- Kimura S, Fujita N, Noda T, Yoshimori T. Monitoring autophagy in mammalian cultured cells through the dynamics of LC3. Methods Enzymol. 2009; 452:1–12. Epub 2009/02/10. doi: S0076-6879(08) 03601-X [pii] https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)03601-X PMID: 19200872.
- Rubinstein AD, Eisenstein M, Ber Y, Bialik S, Kimchi A. The autophagy protein Atg12 associates with antiapoptotic Bcl-2 family members to promote mitochondrial apoptosis. Mol Cell. 2011; 44(5):698–709. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.10.014 PMID: 22152474.
- Guevin C, Lamarre A, Labonte P. Novel HCV replication mouse model using human hepatocellular carcinoma xenografts. Antiviral Res. 2009; 84(1):14–22. Epub 2009/07/23. doi: S0166-3542(09)00387-8 [pii] https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.07.009 PMID: 19622372.
- Blanchet M, Seidah NG, Labonte P. SKI-1/S1P inhibition: a promising surrogate to statins to block hepatitis C virus replication. Antiviral Res. 2012; 95(2):159–66. Epub 2012/05/26. https://doi.org/10.1016/j. antiviral.2012.05.006 PMID: 22626636.
- Hosokawa N, Hara Y, Mizushima N. Generation of cell lines with tetracycline-regulated autophagy and a role for autophagy in controlling cell size. FEBS Lett. 2006; 580(11):2623–9. https://doi.org/10.1016/j. febslet.2006.04.008 PMID: 16647067.
- Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, et al. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. J Cell Sci. 2003; 116(Pt 9):1679–88. Epub 2003/04/01. PMID: 12665549.
- Chen YJ, Chen YH, Chow LP, Tsai YH, Chen PH, Huang CY, et al. Heat shock protein 72 is associated with the hepatitis C virus replicase complex and enhances viral RNA replication. J Biol Chem. 2010; 285 (36):28183–90. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.118323 PMID: 20601427; PubMed Central PMCID: PMC2934683.
- Eyre NS, Fiches GN, Aloia AL, Helbig KJ, McCartney EM, McErlean CS, et al. Dynamic imaging of the hepatitis C virus NS5A protein during a productive infection. J Virol. 2014; 88(7):3636–52. https://doi. org/10.1128/JVI.02490-13 PMID: 24429364; PubMed Central PMCID: PMC3993538.
- Soderberg O, Gullberg M, Jarvius M, Ridderstrale K, Leuchowius KJ, Jarvius J, et al. Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. Nat Methods. 2006; 3(12):995– 1000. https://doi.org/10.1038/nmeth947 PMID: 17072308.
- Le QT, Blanchet M, Seidah NG, Labonte P. Plasma Membrane Tetraspanin CD81 Complexes with Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) and Low Density Lipoprotein Receptor (LDLR), and Its Levels Are Reduced by PCSK9. J Biol Chem. 2015; 290(38):23385–400. Epub 2015/07/22. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.642991 PMID: 26195630; PubMed Central PMCID: PMC4645619.

- Kaufmann A, Beier V, Franquelim HG, Wollert T. Molecular mechanism of autophagic membrane-scaffold assembly and disassembly. Cell. 2014; 156(3):469–81. <u>https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.022</u> PMID: 24485455.
- Kuma A, Mizushima N, Ishihara N, Ohsumi Y. Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5. Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. J Biol Chem. 2002; 277(21):18619–25. https://doi.org/10.1074/jbc.M111889200 PMID: 11897782.
- 45. Matsushita M, Suzuki NN, Obara K, Fujioka Y, Ohsumi Y, Inagaki F. Structure of Atg5.Atg16, a complex essential for autophagy. J Biol Chem. 2007; 282(9):6763–72. Epub 2006/12/29. doi: M609876200 [pii] https://doi.org/10.1074/jbc.M609876200 PMID: 17192262.
- Zhao Q, Hu ZY, Zhang JP, Jiang JD, Ma YY, Li JR, et al. Dual Roles of Two Isoforms of Autophagyrelated Gene ATG10 in HCV-Subgenomic replicon Mediated Autophagy Flux and Innate Immunity. Sci Rep. 2017; 7(1):11250. https://doi.org/10.1038/s41598-017-11105-3 PMID: 28900156; PubMed Central PMCID: PMCPMC5595887.
- Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. Int J Biochem Cell Biol. 2004; 36(12):2503–18. Epub 2004/08/25. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.05.009 PMID: 15325588.
- Fujita N, Hayashi-Nishino M, Fukumoto H, Omori H, Yamamoto A, Noda T, et al. An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and causes defects in autophagosome closure. Mol Biol Cell. 2008; 19(11):4651–9. Epub 2008/09/05. https://doi.org/10.1091/mbc.E08-03-0312 PMID: 18768752; PubMed Central PMCID: PMC2575160.
- Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. Mol Biol Cell. 2008; 19(5):2092–100. Epub 2008/ 03/07. https://doi.org/10.1091/mbc.E07-12-1257 PMID: 18321988; PubMed Central PMCID: PMC2366860.
- Hanada T, Noda NN, Satomi Y, Ichimura Y, Fujioka Y, Takao T, et al. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. J Biol Chem. 2007; 282(52):37298–302. https:// doi.org/10.1074/jbc.C700195200 PMID: 17986448.
- Mohl BP, Bartlett C, Mankouri J, Harris M. Early events in the generation of autophagosomes are required for the formation of membrane structures involved in hepatitis C virus genome replication. J Gen Virol. 2016; 97(3):680–93. https://doi.org/10.1099/jgv.0.000387 PMID: 26727924.
- Romanov J, Walczak M, Ibiricu I, Schuchner S, Ogris E, Kraft C, et al. Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. EMBO J. 2012; 31(22):4304–17. https://doi.org/10.1038/emboj.2012.278 PMID: 23064152; PubMed Central PMCID: PMC3501226.
- Doring T, Zeyen L, Bartusch C, Prange R. Hepatitis B Virus Subverts the Autophagy Elongation Complex Atg5-12/16L1 and Does Not Require Atg8/LC3 Lipidation for Viral Maturation. J Virol. 2018; 92(7). https://doi.org/10.1128/JVI.01513-17 PMID: 29367244.
- Metz P, Chiramel A, Chatel-Chaix L, Alvisi G, Bankhead P, Mora-Rodriguez R, et al. Dengue Virus Inhibition of Autophagic Flux and Dependency of Viral Replication on Proteasomal Degradation of the Autophagy Receptor p62. J Virol. 2015; 89(15):8026–41. https://doi.org/10.1128/JVI.00787-15 PMID: 26018155; PubMed Central PMCID: PMCPMC4505648.
- Granato M, Santarelli R, Farina A, Gonnella R, Lotti LV, Faggioni A, et al. Epstein-barr virus blocks the autophagic flux and appropriates the autophagic machinery to enhance viral replication. J Virol. 2014; 88(21):12715–26. https://doi.org/10.1128/JVI.02199-14 PMID: 25142602; PubMed Central PMCID: PMCPPMC4248894.
- Tian L, Yang Y, Li C, Chen J, Li Z, Li X, et al. The cytotoxicity of coxsackievirus B3 is associated with a blockage of autophagic flux mediated by reduced syntaxin 17 expression. Cell Death Dis. 2018; 9 (2):242. https://doi.org/10.1038/s41419-018-0271-0 PMID: 29445155; PubMed Central PMCID: PMCPMC5833838.
- Santana S, Bullido MJ, Recuero M, Valdivieso F, Aldudo J. Herpes simplex virus type I induces an incomplete autophagic response in human neuroblastoma cells. J Alzheimers Dis. 2012; 30(4):815–31. Epub 2012/04/06. https://doi.org/10.3233/JAD-2012-112000 PMID: 22475795.