



université PARIS-SACLAY

'EPISSAGE ALTERNATIF DU VIRUS DE L'HÉPATITE B ET PATHOGENÈSE HÉPATIQUE' PAR YASSMINA MANDOURI

Discipline: Virologie, Laboratoire: LGBC - EA 4589 - Laboratoire De Génétique Et Biologie Cellulaire et l'Unité INSERM 1135- Centre d'immunologie et de maladies infectieuses.

Résumé

Le Virus de l'Hépatite B (VHB) reste un problème majeur de santé publique, avec près de 250 millions de porteurs chroniques dans le monde. L'épissage alternatif du VHB n'est pas nécessaire à la réplication virale. Toutefois l'ARNprégénomique (ARNpg), matrice de cette réplication, peut être épissé (ARNSP1). Cet ARN SP1 peut-être encapsidé et sécrété sous forme de particules virales défectives (dHBV) car délété d'environ 1/3 du génome viral. De plus, cet ARN épissé peut être traduit en une nouvelle protéine virale, la protéine HBSP. Notre groupe de recherche a suggéré une corrélation entre la sévérité de la pathogenèse hépatique et la production de particules dVHB. Le but de notre travail a été de comprendre les mécanismes de régulation impliqués dans la synthèse de ces particules défectives du VHB.

A travers un travail, sur deux cohortes de patients chroniquement infectés, nous avons montré, qu'il existait un épissage alternatif du VHB différentiel selon les patients. De plus, nous avons montré que la proportion de dVHB était le reflet de la proportion d'ARNSP1.

Enfin, chez des porteurs chroniques présentant une atteinte hépatique plus sévère nous avons montré que la proportion de particules dVHB augmentait avec la sévérité de l'atteinte hépatique. Nous avons exploré la variabilité génétique du génome viral dans une région considérée comme régulatrice de l'épissage alternatif du VHB sans identifier de mutation rendant compte d'une cis régulation de cet épissage. Nos travaux de recherche ont également permis d'explorer la trans-régulation de l'épissage alternatif du VHB. D'une part, grâce à l'identification in vitro, des partenaires protéiques de l'ARNpg, dont environ 20% étaient impliquée dans les mécanismes d'épissage. Et d'autre part, sur un modèle de souris transgénique pour le génome complet du VHB en induisant chimiquement une fibrose et une inflammation hépatique. L'atteinte hépatique dans ce modèle a conduit à une augmentation de la proportion de l'ARNSP1. Cette activité post-transcriptionnelle est associée à une augmentation de l'expression des certains facteurs d'épissage, suggérant leurs implications dans l'épissage alternatif du VHB. In vitro, nous avons confirmé l'impact de trois de ces facteurs sur l'épissage du VHB. Enfin, la modulation de l'expression de l'ARN SP1 dans le foie de porteurs chroniques du VHB est également associée avec une surexpression de deux de ces facteurs d'épissage. La synthèse de l'ARN SP1 du VHB conduit à l'expression de la protéine HBSP qui en modulant l'atteinte hépatique, pourrait favoriser la persistance virale au cours de la progression de la maladie. En conclusion, nos travaux révèlent un mécanisme de régulation de l'épissage alternatif du VHB et identifient son impact au cours de la pathogenèse hépatique.

Mots-clés : Virus de l'Hépatite B, épissage alternatif, particules défectives, pathogenèse virale, trans-régulation de l'épissage, cis-régulation de l'épissage

Abstract

Hepatitis B virus (HBV) infection is a major public health problem with almost 250 million chronic carriers. HBV alternate splicing is dispensable for viral replication. However, HBV pregenomic RNA (pgRNA) can be alternate spliced. The major spliced viral mRNA (SP1), is packaged, reverse transcribed and leads to the secretion of defective viral particles, lacking 1/3 of viral genome. Moreover, SP1RNA can be translated to a new viral protein, HBSP. Our group suggested an influence of hepatic pathogenesis on dHBV particles production.

The aim of our study was to understand the regulatory mechanisms involved in the synthesis of these HBV defective particles.

Through our work on two HBV chronic carrier cohorts, we showed a differential HBV alternate splicing between patients. In addition, we showed that dHBV proportion reflected SP1RNA proportion. Finally, we have shown that dHBV proportion increased

with the severity of liver disease in chronic carriers. We explored the genetic variability of HBV viral genome. In one of the nucleotide region possibly associated to the regulation of HBV alternate splicing, no mutation reflecting a cis-regulation of HBV alternate splicing was identified. Thus, our research focused on trans-regulation of HBV alternative splicing. Firstly, we developed a RNA pull down to identify proteins interacting with HBV pgRNA. About 20% of them were involved in splicing mechanisms. In parallel, we have induced liver fibrosis and liver inflammation in transgenic mice expressing HBV full genome. Hepatic damage analysis showed no difference compared to wild type control mice. In contrast, liver injury induced an increase of SP1RNA proportion. This post-transcriptional activity is associated with a modulation of certain splicing factors expression capable to interact with HBV pgRNA. We confirmed in vitro the impact of some of these factors on HBV alternate splicing regulation. The modulation of SP1RNA expression was studied in the liver of HBV chronic carriers. This analysis confirmed the association of SP1 RNA detection with the modulation of splicing factors. In conclusion, our data highlighted the mechanism of regulation of alternate splicing of HBV according to the severity of liver disease and depending on splicing factors expression. HBV SP1 RNA allows the expression of HBSP protein, able to modulate liver disease and thus might favor viral persistence during disease progression.

Keywords : Hepatitis B virus, alternate splicing, defectives particles, viral pathogenesis, trans-regulatory splicing proteins, cis-regulation splicing

INFORMATIONS COMPLÉMENTAIRES

Monsieur Didier Auboeuf, Directeur de Recherche, Université de Lyon – Rapporteur

Monsieur David Durantel, Chargé de Recherche, Université de Lyon – Rapporteur

Madame Delphine Sitterlin, Maître de Conférences, Université Versailles

Saint-Quentin-en-Yvelines – Co-Directrice de thèse

Monsieur Patrick Soussan, Maître de Conférences-Praticien Hospitalier, Université

Paris Descartes – Co-Directeur de thèse

Monsieur Jean-Louis Gaillard, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier,

Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines – Examineur

Madame Isabelle Chemin, Directrice de Recherche, Université de Lyon– Examineur

Madame Marie-Louise Michel, Directrice de Recherche, Université Paris 7–

Examineur

Contact :

DREDVal service FED : theses@uvsq.fr

